

THESIS

MUNICH

1968

ZWEI MITOCHONDRIENTYPEN DER RATTENLEBER UND IHR VERHALTEN
BEI ÜBER- UND UNTERFUNKTION DER SCHILDDRÜSE

WOLFGANG SIPPELL

L



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. Theodor BÜCHER

ZWEI MITOCHONDRIENTYPEN DER RATTENLEBER UND IHR VERHALTEN
BEI ÜBER- UND UNTERFUNKTION DER SCHILDDRÜSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

WOLFGANG SIPPELL

aus Kirchheim/Teck

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. med. Dirk PETTE

Korreferent: Professor Dr. rer. nat. Dr. med. h. c.
Theodor BÜCHER

Dekan: Professor Dr. med. Frank MARGUTH

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Dezember 1968

Dem Andenken
meines Vaters und meines Bruders

- - -

Meiner lieben Mutter
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einführung	1
Methodik	6
I. Substanzen	6
II. Tiermaterial; Erzeugung von Hyper- und Hypothyreose	7
III. Mitochondrienpräparation und fraktionierte Extraktion der Rattenleber	8
1. Fraktionierte Extraktion	8
2. Isolierung der Mitochondrien	8
IV. Auftrennung der Mitochondrien	9
1. Durch Differentialzentrifugation	9
2. Durch Dichtegradientenzentrifugation	9
3. Durch Elektrophorese	11
V. Gradientenfraktionierung	12
VI. Bestimmung der Enzymaktivitäten	15
1. Bei vollständiger Fraktionierung des Gradienten	15
2. Bei präparativer Isolierung der Mitochondrien	15
3. Reihenfolge der Messungen; Enzymstabilität	16
4. Durchführung der einzelnen Enzymtests	16
VII. Bestimmung des Proteingehaltes	22
VIII. Berechnung extramitochondrialer Enzymaktivitäten	23
1. SDH-Faktor	23
2. Mitochondriengehalt der Leber	23
IX. Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse	24

	Seite
Ergebnisse	25
I. Befunde an normalen (euthyreoten) Ratten-lebermitochondrien	25
1. Verteilung der Mitochondrien im Dichte- gradienten	25
2. Verteilung von Enzymaktivitäten im Dichte- gradienten	25
3. Enzymatische Analyse und Proteingehalt der isolierten Mitochondrien vom Typ I und II	28
4. Intaktheit der isolierten Mitochondrien	34
II. Einflüsse von Hyper- und Hypothyreose auf beide Mitochondrientypen	38
1. Lokalisation im Dichtegradienten	38
2. Menge des isolierten Mitochondrienproteins	39
3. Enzymaktivitätsmuster	39
4. Induzierbarkeit der einzelnen Enzyme	45
5. Proportionen mitochondrialer Enzym- aktivitäten	48
III. Einflüsse von Hyper- und Hypothyreose auf gesamtzelluläre Enzymaktivitäten	49
1. Extramitochondriale Aktivitäten "intra- zellulär-mehrörtiger" Enzyme	49
2. Zelluläre Proportionen	50
3. Induzierbarkeit zellulärer Enzymakti- vitäten	50
4. Synopsis gesamtzellulärer Enzymakti- vitäten und ihrer Bewegungen	52

	Seite
Diskussion	56
I. Heterogenität der Mitochondrienpopulation der Rattenleber	57
1. Auftrennbarkeit in zwei hauptsächliche Fraktionen	56
2. Möglichkeiten der Artefakt-Bildung	56
3. Argumente für die Eigenständigkeit beider Mitochondrientypen	57
a. Uneinheitlichkeit beider Fraktionen	57
b. Intaktheit der Typ-I-Mitochondrien	57
c. Konstante und spezifische Enzymproportionen als Ausdruck der metabolischen Differenzierung	58
d. Unterschiedliche Wirkungen des Thyreoidhormons auf beide Mitochondrientypen	59
II. Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien unter histotopischem Aspekt	61
1. Herkunft beider Mitochondrientypen	61
2. Mögliche intralobuläre Verteilung beider Mitochondrientypen	61
3. Zelluläre Differenzierung und Koordination	62
Zusammenfassung	64
Abkürzungen	67
Literatur	70

ZWEI MITOCHONDRIENTYPEN DER RATTENLEBER UND IHR VERHALTEN BEI ÜBER- UND UNTERFUNKTION DER SCHILDDRÜSE

Einführung

Die Frage, ob die Mitochondrienpopulation innerhalb eines bestimmten Organs in sich einheitlich ist oder aber eine definitive Heterogenität aufweist, beschäftigt Morphologen wie Biochemiker seit längerer Zeit. Sie wird in der Literatur der letzten 15 Jahre recht widersprüchlich, sowohl positiv als auch negativ beantwortet. Dabei stützen sich positive Argumente für die Existenz verschiedener Mitochondrientypen beispielsweise in der Leber auf morphologische, biochemische und histochemische Befunde, während negative Argumente im wesentlichen nur auf morphologischen und biochemischen Untersuchungen basieren.

Bereits 1955 sind HOGEBOOM und SCHNEIDER ¹ der Meinung, daß die Ergebnisse ihrer Mitochondrienfraktionierungen ^{2, 3} für eine biochemische Heterogenität der Mitochondrienpopulation sprächen, endgültige Beweise aber bisher noch fehlten. Dabei klammern sie das sog. "fluffy layer", eine lockere, helle Oberschicht der mitochondrialen Niederschläge, ausdrücklich aus. Es wurde von LAIRD et al. ⁴ als eigener Mitochondrientyp kleinerer Größe angesehen, besteht aber nach Ansicht von SCHNEIDER ¹ und auch NOVIKOFF ⁵ im wesentlichen aus Mikrosomen. Morphologische Befunde erneuert NOVIKOFF und ESSNER ⁶ sowie NOVIKOFF und SHIN ⁷. Sie fanden in der Peripherie des Leberläppchens wesentlich größere und deutlich mehr Mitochondrien als im Zentrum. Diese Unterschiede werden von BAHR und ZEITLER ⁸ elektronenmikroskopisch an isolierten Mitochondrien bestätigt. Sie beschreiben zwei nach Größe und Form differente Mitochondriengruppen: längliche, schwerere und rundliche, leichtere Partikel. Unterschiedliche morphologische und elektronenoptische Veränderungen an periportalen und perizentralen Lebermitochondrien zeigen WILSON und LEDUC ⁹ nach Verfütterung einer an essentiellen Fettsäuren freien Diät an Mäuse. Ähnlich differente Reaktionen finden PARSONS et al. ¹⁰ und O'HEGARTY ¹¹ an in vitro geschwollenen isolierten Rattenlebermitochondrien nach ATP-Zusatz. Sie konnten drei nach Kontraktionsgrad und Matrixdichte verschiedene Populationen unterscheiden.

Die angeführten morphologischen Beobachtungen werden durch zahlreiche biochemische und histochemische Befunde erweitert. SHANK et al. [12] isolieren mit einer Mikromethode Gewebe aus verschiedenen Bereichen des Leberläppchens und finden, bezogen auf Zellprotein, zwischen peripheren und zentralen Regionen deutliche Unterschiede in der Verteilung der Aktivitätsgehalte einiger Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels.

GEAR [13, 14] gewinnt durch Differentialzentrifugation leichte und schwere Rattenlebermitochondrien und schließt aus Unterschieden im Cytochrom-c-Oxydase- und Cytochrom-a-Gehalt, dem elektronenmikroskopisch 1.4-mal größeren Durchmesser der schwereren Partikel sowie dem unterschiedlichen Verhalten während der Leberregeneration auf Eigenständigkeit der beiden isolierten Typen. Außerdem untersucht er das "fluffy layer", das im wesentlichen aus jungen, unfertigen und alten, degenerierten Mitochondrien bestehen soll, und führt schließlich Argumente für die "de novo"-Entstehung der Mitochondrien an. Auch FRISELL et al. [15] isolieren leichte und schwere Mitochondrien; die leichte Fraktion besitzt niedrigere Werte für lösliches Protein und zwei Enzyme des löslichen mitochondrialen Compartiments, dagegen höheren Lipidgehalt. Es soll sich dabei eventuell um neue Mitochondrien handeln.

Fünf verschieden dichte Mitochondrienfraktionen isolieren LUSENA und DEPOCAS [16] ebenfalls aus Rattenleber. Die dichteste Fraktion zeigt sich am auffälligsten gegen Einfrieren und Auftauen und ist auch beim Schwellen unter dem Mikroskop am fragilsten. Die Fraktionen unterscheiden sich auch durch die Menge an eingebautem Material, nicht aber strukturell und funktionell. Die Autoren glauben daher, daß der dichteste Typ der älteste, der leichteste Typ der jüngste sei. Ähnliche Beobachtungen machen WILLIAMS und PARSONS [17]: Sie finden unterschiedliche Fragilität leichter und schwerer Mitochondrien bei Ultraschall-Behandlung. SWICK et al. [18] können Rattenlebermitochondrien aufgrund ihrer Partikelgröße in 28 Fraktionen auftrennen. Aus der Analyse der Enzymverteilung schließen sie auf zwei Populationen mit unterschiedlichem mittlerem Partikeldurchmesser, jedoch gleichartiger Enzymausrüstung; die großen Mitochondrien sollen dabei nur aufgrund ihres höheren Matrixanteils größer sein.

Auch an anderen Geweben wurde Heterogenität der Mitochondrienpopulation festgestellt. TOLANI und TALWAR [19] finden deutliche Unterschiede in der spezifischen Cytochromoxydase-Aktivität verschiedener

Regionen des Affenhirns. Da es sich dabei um ein mitochondriales Enzym handelt, scheinen die Mitochondrien der einzelnen Gehirnabschnitte konstitutionell unterschiedlich zu sein.

Intrazelluläre Heterogenität nachzuweisen gelang AVERS et al. [20] durch elektronenoptische, enzymatische und histochemische Untersuchungen an *Saccharomyces cerevisiae*. Cytochromoxydase-positive und Cytochromoxydase-negative Mitochondrien innerhalb der Hefezelle sind im selben zahlenmäßigen Verhältnis durch Tausende von Generationen hindurch nachweisbar; ihre Existenz muß also von einer intramitochondrialen Information abhängen. Diese Befunde stellen somit **zumindest** eine vorläufige Antwort auf die alte Frage [1] dar, ob die unterschiedlichen Mitochondrien - nach erwiesener Heterogenität in einem bestimmten Organ - in ein und derselben Zelle vorkommen könnten, oder ob die verschiedenen Mitochondrientypen immer in bestimmten Zellen, dort aber homogen vorhanden sind.

Jedoch auch negative Argumente, durch die keine mitochondriale Heterogenität festgestellt wird oder die entsprechende Untersuchungsergebnisse als Artefakte erscheinen lassen, finden sich in der Literatur.

Elektronenmikroskopisch können BURGOS et al. [21] an isolierten Nierenmitochondrien der Ratte zwar drei Typen von unterschiedlichem Volumen und unterschiedlicher optischer Dichte in fast gleichem zahlenmäßigem Verhältnis unterscheiden; nach Auffassung der Autoren handelt es sich dabei aber lediglich um unterschiedliche reversible Funktionsstadien ein und desselben normalen Mitochondrientyps.

Aus Mitochondrien von *Neurospora crassa* isoliert LUCK [22, 23] zwei Typen, die sich in der Dichte und der Einbaurate von Phospholipiden und Protein unterscheiden, - funktionell, d. h. in spezifischen Enzymaktivitäten, jedoch keine Unterschiede aufweisen. Er schließt daraus, daß sich die Mitochondrien durch Teilung vermehren - im Gegensatz beispielsweise zur oben zitierten Ansicht von GEAR [14].

In mehreren Arbeiten von GREEN, LESTER, HATEFI et al. [24, 25, 26] wird eine leichte Fraktion von Rinderherz-Mitochondrien beschrieben, die trotz geringerer Oxydationsraten für einige Substrate einen nur unwesentlich kleineren P/O-Quotienten als die schwere Fraktion aufweist. Da aber die leichte Fraktion durch Einfrieren und Auftauen immer wieder aus der schweren entstehen kann, glauben die Autoren, daß erstere lediglich ein Präparations-Artefakt der schweren, originalen Mitochondrienfraktion ist. Dies steht in gewissem Widerspruch zu neueren Befunden von

FRISELL [15], der auch bei 4-fach längerer Homogenisationsdauer ein gleichbleibendes quantitatives Verhältnis von leichten und schweren Mitochondrien erhält.

Die stärksten Argumente schließlich, die gegen verschiedene Mitochondrientypen z.B. in der Leber sprechen, stammen aus dem Arbeitskreis um DE DUVE. Aufgrund von Messungen mehrerer mitochondrialer Enzyme in Subfraktionen von Rattenlebermitochondrien, die durch Dichtegradientenzentrifugation erhalten wurden, kommen BEAUFAY et al. [27] bereits vor Jahren zu dem Schluß, daß in einer Reihe von Eigenschaften, wie Größe, Dichte, osmotisches Verhalten und Enzymgehalt die Mitochondrien eine homogene Gruppe von Zellorganellen darstellen. Eingeschränkt wird diese Ansicht allerdings sogar von DE DUVE selbst, der an anderer Stelle [28] sagt: "Die oben gefundene Heterogenität ist nur eine statistische. Sind unsere Techniken erst einmal empfindlich genug, werden sie auch die Heterogenität der Mitochondrien aufzeigen, die zweifellos existiert, - besonders aufgrund histochemischer Befunde für die unterschiedliche Verteilung mancher Enzyme und der Existenz heterogener Zelltypen in der Leber."

Tatsächlich bietet die Histotopik mitochondrialer Enzyme im Leberläppchen deutliche Argumente für die Existenz unterschiedlicher Mitochondrienpopulationen des Parenchyms. Die von H. H. SCHUMACHER [29] und von RUTENBURG und SELIGMAN [30] nachgewiesenen höheren Aktivitätsgehalte an SDH und Cytochromoxydase der periportalen Parenchymzellen des Leberläppchens lassen sich noch durch die Annahme eines höheren Mitochondriengehaltes der periportalen im Vergleich zu den perizentralen Parenchymzellen deuten. Diese Deutung erweist sich aber als unzureichend im Hinblick auf die von PETTE und BRANDAU [31] mit Hilfe des Gelschicht-Verfahrens gewonnenen Einblicke in die intralobuläre Verteilung weiterer mitochondrialer Dehydrogenasen. Diese Autoren zeigten, daß die intralobuläre Verteilung der GluDH und der T-IDH derjenigen von SDH und Cytochromoxydase geradezu entgegengesetzt ist - in den perizentralen Parenchymzellen sind diese beiden Pyridinnucleotid-abhängigen Dehydrogenasen mit höherer Aktivität vertreten als in den periportalen. Im Falle der mitochondrial-strukturegebundenen GP-Ox wurden dagegen keine Unterschiede in den Aktivitätsgehalten peripherer und zentraler Parenchymzellen festgestellt. Da es sich mit Ausnahme der T-IDH bei den genannten Enzymen um ausschließlich intramitochondrial lokalisierte Dehydrogenasen handelt, ergeben sich aus der Enzymtopik direkte Beziehungen zur intralobulären Verteilung der Mitochondrien.

Die Heterotopie bestimmter mitochondrialer Dehydrogenasen besagt nämlich, daß die Aktivitäten dieser Enzyme in den Mitochondrien periportal und perizentraler Parenchymzellen in unterschiedlichem Verhältnis, d.h. in spezifischen Proportionen zueinander stehen. Bei der vergleichenden Analyse von Enzymaktivitätsmustern der Mitochondrien verschiedener Gewebe [32, 33, 34] wurden daher gerade spezifische Proportionen dieser Enzymaktivitätsmerkmale mitochondrialer Differenzierung herausgestellt. Werden diese Erkenntnisse auf die oben geschilderten Befunde angewandt, so kann die Heterotopie bestimmter mitochondrialer Dehydrogenasen des Leberläppchens nur als Ausdruck der Existenz verschiedener Mitochondrienpopulationen mit unterschiedlicher Verteilung im Leberläppchen gedeutet werden.

In der vorliegenden Arbeit wird nun der Versuch unternommen, die Existenz differenter Mitochondrienpopulationen der Leber direkt nachzuweisen. Die Untersuchungen gründen sich auf die Isolierung unterschiedlicher Mitochondrientypen mit Hilfe verschiedener Methoden. Auf den Erkenntnissen der vergleichenden Analyse von Enzymaktivitätsmustern aufbauend, erfolgt die Charakterisierung der isolierten Mitochondrientypen anhand ihrer enzymatischen Ausstattung. Weitere Einblicke in die Heterogenität der isolierten Mitochondrienpopulationen bieten die in dieser Arbeit mitgeteilten Beobachtungen über unterschiedliche Effekte bei hormonell induzierten Veränderungen der mitochondrialen Enzymaktivitätsmuster.

Ein Teil der Ergebnisse dieser Untersuchungen wurde von BRDICZKA, PETTE und SIPPELL bereits mitgeteilt [35, 36].

Methodik

I. Substanzen:

Die verwendeten Enzyme (MDH als Hilfsenzym; HAD, CE, GOT, IDH für Substrat-Tests) stammten, ebenfalls wie die Coenzyme DPNH, DPN, TPN, Coenzym A sowie ADP, Cytochrom c und Glutathion (GSH) von C.F. Boehringer+Söhne (Mannheim). Phenazinmethosulfat (PMS) wurde von Sigma (St. Louis/Missouri), Albumin (Serumalbumin vom Rind) von den Behringwerken (Marburg/Lahn) bezogen.

Fast alle Substrate sowie TRA waren von Boehringer, mit Ausnahme von α -Glycerophosphat (α -D, L-Glycerophosphat puriss. p. a.), p-Nitrophenol und p-Nitrophenylphosphat (jeweils puriss. p. a.), die von Fluka (Buchs/Schweiz), sowie Isocitrat (D. L-Isocitric acid lactone, allo free) und Malat (L-Malic acid), die von Calbiochem (San Francisco/Calif.) bezogen wurden.

Das anfänglich verwendete Thyreoidpulver (Thyroid U. S. P.) stammte von der Nutritional Biochemicals Corporation (Cleveland/Ohio), Propylthiouracil von der Fluka AG. Trijodthyronin (Na-3,3', 5-Trijod-2-thyronin) wurde von Sigma, Methylmercaptimidazol (1-Methyl-2-mercaptimidazol = Favistan^R) von den Asta-Werken (Brackwede/Westfalen) geliefert.

Alle übrigen Substanzen, auch Saccharose (puriss. pro injectione), kamen in p. a. -Qualität von der E. Merck AG (Darmstadt).

Acetyl-CoA wurde jeweils in kleiner Menge durch Kondensation von reduziertem Coenzym A mit frisch destilliertem Essigsäureanhydrid hergestellt. Nach pH-Einstellung auf 7 bis 7.5 war es eingefroren bei -20°C einige Wochen haltbar.

Ähnlich wurde Acetoacetyl-CoA bereitet. Frisch und vollständig - mittels Kaliumborhydrid im Alkalischen bei 37°C - reduziertes Coenzym A wurde nach Neutralisation mit frisch destilliertem Diketen versetzt. Überschüssiges Diketen wurde bei pH 4 - 5 durch Ausschütteln mit wassergesättigtem Äther entfernt. Acetoacetyl-CoA hielt sich eingefroren ebenfalls einige Wochen.

Die Molarität der bereiteten Substratlösungen und ihre Haltbarkeit wurden im optisch-enzymatischen Test kontrolliert.

II. Tiermaterial, Erzeugung von Hyper- und Hypothyreose:

Für die Versuche wurden 120 bis 150 g schwere männliche Wistar-II-Ratten verwendet, die Wasser und die Standarddiät Altromin (Fa. Altrogge, Lage/Lippe) erhielten und getrennt nach eu-, hyper- und hypothyreoten Tieren in Gruppen zu je 4 bis 6 Tieren gleichen Wurfs in Spezialkäfigen bei konstanter Raumtemperatur gehalten wurden.

In den ersten Versuchen wurde Hyperthyreose durch dreiwöchige ad-libitum-Verfütterung von Thyreoidpulver erzeugt, das 2%ig mit gemahlenem Altromin vermischt war. Hypothyreoter Status wurde entsprechend durch sechswöchige Verfütterung einer an Propylthiouracil 0.15%igen Diät erreicht. Da jedoch hierbei die von den Tieren aufgenommene Menge an Schilddrüsenhormon bzw. Thyreostaticum nur schlecht kontrolliert werden kann und individuell stark schwankt, da immer mehrere Tiere besonders das Thiouracilfutter schlecht annahmen oder nicht tolerierten und unter Gewichtsverlust und Anämie zum Teil ad exitum kamen, wurde sehr bald auf parenterale Applikation übergegangen.

So wurde Hyperthyreose nach 8-tägiger täglicher intraperitonealer Injektion von 0.2 mg Trijodthyronin (T₃T) in 1 ml physiol. NaCl-Lösung (mit NaOH bei pH 8 bis 9 in Lösung gebracht) erzeugt, Hypothyreose hingegen durch tägliche i.p. -Injektion von Methylmercaptimidazol (MMI)

= Favistan[®] in einer Dosierung von 50 mg/kg Körpergewicht über 10 Tage. Als Richtlinien für die Dosierung dienten die Angaben von KADENBACH [34] sowie von BROCK und LORENZ [38]. Als Kontrollen dienten jeweils Tiere desselben Wurfs, denen gleichzeitig ein entsprechendes Volumen physiol. Kochsalzlösung (steril und pyrogenfrei) injiziert wurde.

Die Injektionen wurden von den Tieren gut toleriert, diese zeigten während der T₃T-Behandlung Konstanz oder geringfügige Abnahme des Körpergewichts (siehe auch [37]), während sich bei den Kontrolltieren eine (physiologische) Gewichtszunahme von durchschnittlich 15% bei den mit MMI behandelten hypothyreoten Tieren dagegen eine stärkere Zunahme von rund 27 % des Ausgangsgewichts ergab.

III. Mitochondrienpräparation und fraktionierte Extraktion der Rattenleber:

Ein bis zwei hyper- oder hypothyreote Ratten, die die letzten 12 bis 15 h gehungert hatten, wurden durch Genickschlag und Entbluten getötet. Die Lebern wurden (ohne periportales Bindegewebe) sofort entnommen und durch kurzes Spülen mit eisgekühltem 0,3 M Saccharosemedium (10 mM TRA, 2 mM EDTA, pH 7,4) von Blutresten etc. befreit. Ebenso wurden die Lebern euthyreoter Kontrolltiere gewonnen und in jedem Versuch parallel mit den induzierten Lebern weiterverarbeitet. Sämtliche Arbeitsvorgänge erfolgten in der Kälte bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$ unter standardisierten Bedingungen. Ca. 7 g der kleingeschnittenen Leber wurden mit dem 4-fachen Volumen kalten Mediums in einem locker gängigen Teflon-Glas-Potter (mit nicht aufgerauhter Glaswand) im Eisbad homogenisiert, wobei der Stempel 700 U/min und insgesamt 20 Auf- und Abwärtsbewegungen machte. Anschließend wurde mit Saccharosemedium auf das 10-fache Ausgangsvolumen, also rund 70 ml, aufgefüllt. Ein kleiner Teil dieses 10%igen Leberhomogenats wurde zur fraktionierten Extraktion verwendet, während der größere Teil zur Isolierung der Mitochondrien diente.

1. Fraktionierte Extraktion:

Sie erfolgte parallel zur Mitochondrienisolierung auf folgende Weise [33]: je 8 ml des 10%igen Homogenats wurden 20 min im Eisbad durch kontinuierliches Rühren ("Plümpern" mit 80 Schwingungen pro min) extrahiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei $100\,000 \times g$ wurden die Überstände vorsichtig dekantiert, die Sedimente in je 8 ml Saccharosemedium resuspendiert und anschließend durch Ultraschall-Behandlung, wie unten beschrieben, desintegriert. In den Überständen wurden lösliche Enzyme in folgender Reihenfolge bestimmt: CE, HAD, MDH, GOT, GluDH, T-IDH; wo erforderlich, erfolgte die Aktivitätsbestimmung nach 1 : 40 - Verdünnung in 10 mM TRA-Albumin-Puffer. Die strukturgebundenen Enzyme GP-Ox und SDH wurden in den zum Teil auf 1 : 10 bzw. 1 : 20 mit Phosphatpuffer verdünnten desintegrierten Sedimentsuspensionen gemessen.

2. Isolierung der Mitochondrien:

Aus der Hauptmenge des Homogenats wurden in Anlehnung an das von SCHNEIDER und HOGEBOOM [39] beschriebene Verfahren nach Abtrennung der Kerne und Zelltrümmer bei $500 \times g$ (10 min) in der Sorvall-Kühlzentrifuge die Mitochondrien bei $20\,000 \times g$ 20 min lang abzentrifugiert und

einmal in Saccharosemedium gewaschen. Hierzu wurde der Mitochondrien-niederschlag in einem auf das Ausgangsgewebe bezogenen Verhältnis von 1 : 10 (d.h. ca. 70 ml) mit dem Teflon-Potter resuspendiert und bei $39\,000 \times g$ 20 min lang abzentrifugiert. Das Mitochondriensediment wurde dann, wie Abb. 1 schematisch zeigt, nach verschiedenen Verfahren weiterverarbeitet.

IV. Auftrennung der Mitochondrien:

1. Durch Differentialzentrifugation:

Die nochmals im Verhältnis 1 : 10 resuspendierten Mitochondrien wurden durch jeweils 15 min-Zentrifugation bei 1 000, 5 000 und 20 000 $\times g$ fraktioniert. Die schweren Mitochondrien (Typ II) fanden sich im Sediment der Zentrifugation bei 1 000 $\times g$ (Sediment A). Die leichten Mitochondrien (Typ I) bildeten das Sediment der Zentrifugation bei 20 000 $\times g$ (Sediment C) nachdem eine Zwischenfraktion (Sediment B) bei 5 000 $\times g$ abgetrennt wurde.

2. Durch Dichtegradientenzentrifugation:

Dieses Verfahren wurde in den späteren Versuchen fast ausschließlich angewandt, da es eine sehr saubere Auftrennung besonders der hormoninduzierten bzw. -reprimierten Mitochondrien ermöglicht. Die gewaschenen Mitochondrien wurden in 1.23 M (42%, w/v) Saccharosemedium in stets gleichbleibendem Verhältnis resuspendiert. Mit 10 ml dieser Suspension wurde ein vorgekühlter linearer Saccharosegradient vorsichtig überschichtet. Der Gradient war jeweils ca. 1 h vorher aus je 20 ml 1.7 M und 1.23 M (58 bzw. 42 %, w/v) Saccharosemedium mit Hilfe einer speziell gefertigten Mischmaschine, die aus zwei einzeln absperzbaren, gleichgroßen zylindrischen kommunizierenden Röhren bestand, unter kontinuierlicher Synchronrührung bereitet worden. Seine auch nach der Zentrifugation bestehende Linearität, die durch Fraktionierung und Messung des Saccharosegehalts im Zeiss-Refraktometer mehrmals geprüft wurde, zeigt die Abb. 2. Die Zentrifugation der nach der Beschickung 50 ml enthaltenden Gradientenbecher erfolgte 50 min bei 100 000 $\times g$ im Ausschwingrotor SW-25.2 der Spinco L-2 Ultrazentrifuge (Beckman Instruments). Bremsung des Rotors während des Auslaufens der Zentrifuge veränderte das Zentrifugationsergebnis nicht. Die in unterschiedlicher Höhe des

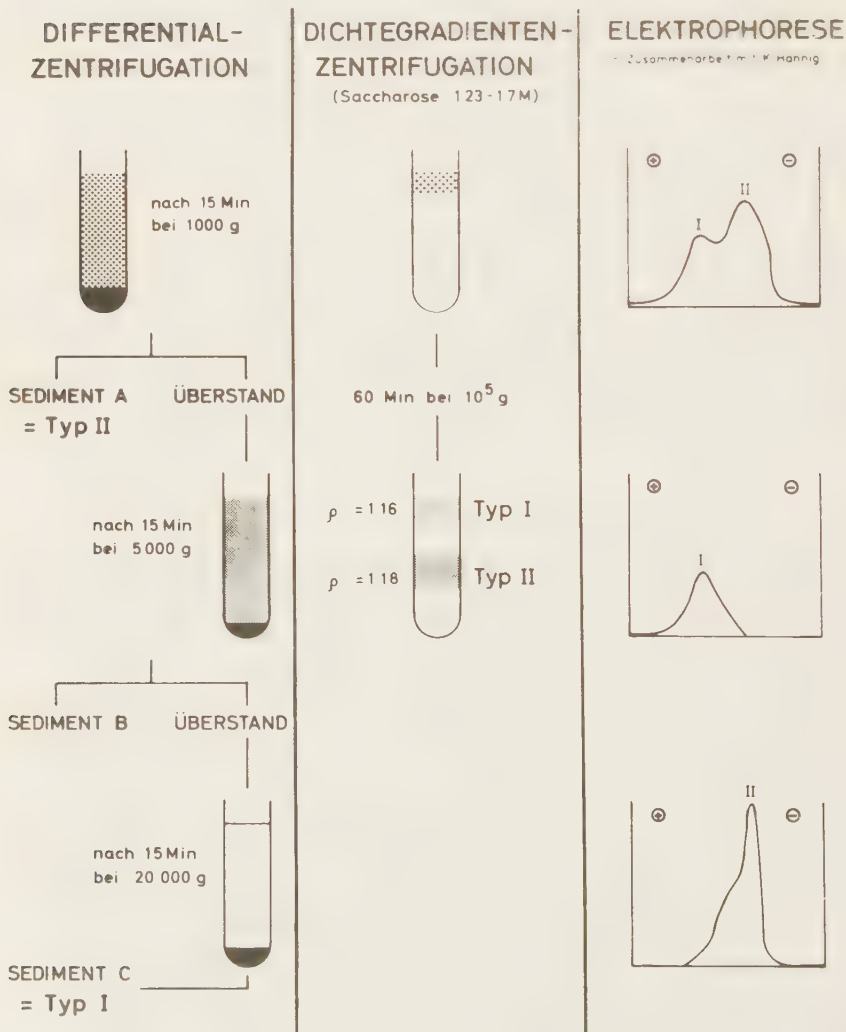


Abb. 1: Verschiedene Verfahren zur Auftrennung von Rattenleber-mitochondrien in zwei Fraktionen.

Gradienten im isopyknischen Gleichgewicht lokalisierten Mitochondrien-schichten wurden dann entweder im Rahmen einer Fraktionierung des gesamten Gradientenbeckers oder selektiv in zwei größeren Fraktionen aus dem Gradienten isoliert.

3. Durch Elektrophorese:

Das in Abb. 1 angegebene dritte Verfahren, die Trennung der beiden Mitochondrientypen mit Hilfe der trägerfreien Ablenkungselektrophorese, wurde

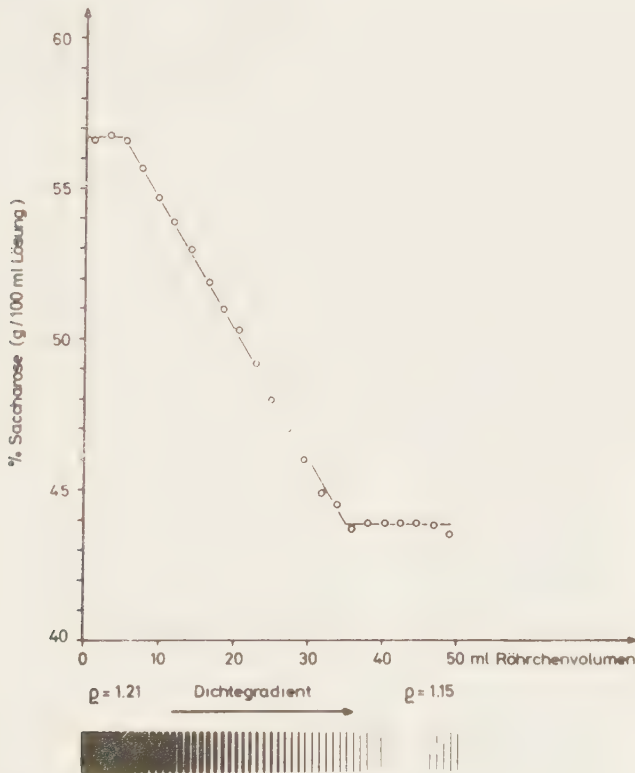


Abb. 2: Saccharosekonzentrationen im Dichtegradienten nach 50 min Zentrifugation bei $100\,000 \times g$ im Ausschwingrotor

in ersten Versuchen von BRDICZKA in Zusammenarbeit mit HANNIG [40] durchgeführt. Diese vorläufigen Studien dienten weniger der Präparation als vielmehr der elektrophoretischen Charakterisierung der beiden Mitochondrientypen. Sie zeigten deutliche Unterschiede in der elektrophoretischen Beweglichkeit.

V. Gradientenfractionierung:

Anfänglich wurde der mittels Stopfen und Schlauchklemme luftdicht verschlossene Gradientenbecher im Zentrum des Röhrchenbodens punktiert, so daß bei behutsamem Öffnen der Klemme die durch Tropfenzahl oder Eichung der Auffanggefäße definierten Fraktionsvolumina fortlaufend durch Abtropfen entnommen werden konnten. Um jedoch eine exakte Reproduzierbarkeit der Fraktionierung, insbesondere der Fraktionsvolumina, zu erhalten, wurde die in Abb. 3 schematisch dargestellte und in Abb. 4 photographierte Fraktioniermaschine entwickelt. Sie erlaubt eine kontinuierliche Entnahme beliebiger, durch Mikrometerschraube exakt definierbarer Volumina auf zweierlei Weise; entweder unten am Röhrchenboden nach Überschichtung des Gradienten mit einem indifferenten, nichtwäßrigen Medium, etwa Paraffinöl, oder oben an der Röhrchenöffnung durch vorsichtiges Hochdrücken des gesamten Gradienten mit konzentrierter Saccharose-lösung (ca. 60 %) und anschließender quantitativer Entnahme der jeweils angehobenen und im Verschiebeaufsatz von Gradienten separierten Fraktion.

Diese letztere Methode erwies sich als besonders geeignet, wenn die beiden Mitochondrienschichten getrennt in zwei größere Fraktionen zu präparativen Zwecken entnommen werden sollten. Das "Anhub"-Verfahren verhinderte nicht nur die gegenseitige Kontamination der Mitochondrienbanden; er ermöglichte durch die Verschiebetechnik auch eine weitgehend turbulenzfreie Trennung der Banden exakt an den Stellen der jeweiligen Trübungsmima. Somit war es einer früher geübten Methode eindeutig überlegen, die in vorsichtigem Absaugen der Mitochondrien mittels einer in die betreffende Schicht eintauchenden, vertikal verschieblichen 20 ml-Vollpipette mit Pipettierhilfe bestand.

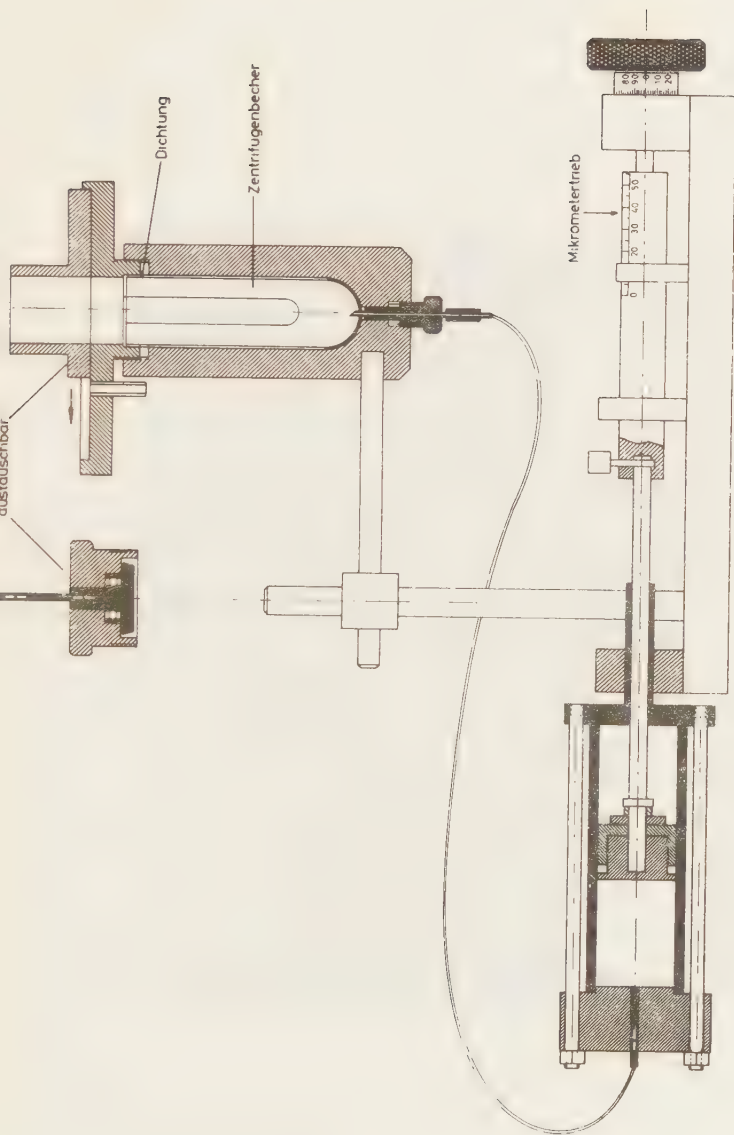


Abb. 3: Schema der Fraktioniermaschine im Aufriß



Abb. 4: Photographie der **F**raktioniermaschine mit aufgeschraubtem
Verschiebeaufsatz

VI. Bestimmung der Enzymaktivitäten:

Je nachdem, ob der Gradient vollständig und fortlaufend in meist 15 bis 25 Fraktionen gleichen Volumens aufgetrennt wurde, oder ob aus einem oder mehreren Gradientenröhrchen gemeinsam nur zwei große Fraktionen entnommen wurden, ergab sich ein unterschiedliches weiteres Vorgehen:

1. Bei vollständiger Fraktionierung des Gradienten:

In diesem ersteren Fall wurden die einzelnen Fraktionen nach Desintegration der Mitochondrien auf mechanischem Wege oder durch Ultraschall (s. u.) direkt im Saccharosemedium des Gradienten der enzymatischen Analyse zugeführt.

2. Bei präparativer Isolierung der Mitochondrien:

Im letzteren, häufigeren Fall der präparativen Isolierung war zunächst ein Abzentrifugieren und Resuspendieren der Mitochondrien in Phosphatpuffer nötig.

Dabei wurde beiden Fraktionen ein kleines Aliquot (meist 10 ml) speziell für die Bestimmung der D-IDH abgenommen und alle vier Proben bei $100\,000 \times g$ 20 min lang abzentrifugiert. Die großen Mitochondrienpellets wurden in je 2 ml (Typ I) bzw. 4 ml (Typ II) Extraktionspuffer (0.1 M Phosphatpuffer pH 7.3), die kleinen, für den D-IDH-Test vorgesehenen Pellets in je 2 ml frisch vorbereitetem Medium nach GOEBELL und KLINGENBERG [41] aufgenommen, das zur Stabilisierung des Enzyms in Extraktionspuffer 10 mM GSH und 1 mM ADP enthielt. Anschließend erfolgte die Desintegration der Mitochondrien entweder mit dem Ultraturrax-Homogenisator (Janke und Kunkel, Stauffen/Baden) 4 x 30 sec bei 20 000 U/min unter Eis/Kochsalz - Kühlung von -4°C oder durch 4 x 10 sec Ultraschall-Behandlung mit dem Branson-Sonifier, Modell S-75 (Branson Instruments, Danbury/Conn.) bei 5 Amp. im Eisbad. Unter diesen Bedingungen führen beide Desintegrationsmethoden zu vergleichbaren Ergebnissen.

In den desintegrierten Mitochondrienhomogenaten konnten nun strukturgebundene Enzyme wie SDH und GP-Ox sofort bestimmt werden, während die Messung der löslichen mitochondrialen Enzyme erst nach Elimination der strukturgebundenen DPNH-Oxydasen der Atmungskette, die bei allen DPNH enthaltenden Testansätzen erheblich störten, erfolgte. Hierzu wurden meist je 0.5 ml der Mitochondrienhomogenate mit einem speziellen TRA-Albumin-Puffer im Verhältnis 1 : 3 verdünnt und in diesem Volumen 20 min

bei $100\,000 \times g$ und 0°C zentrifugiert. In den Überständen wurden dann die löslichen Enzyme getestet; einige (HAD, MDH, GOT, GluDH) nach Weiterverdünnung auf 1 : 30 mit dem erwähnten Puffer, der bei pH 7.6 10 mM TRA, 5 mM EDTA und 0.5 % Albumin enthielt. Der Albuminzusatz verhinderte den Aktivitätsverlust verdünnungsempfindlicher Enzyme, wie der MDH oder HAD, deren Aktivitäten schon bei einer 1 : 10 - Verdünnung mit Aqua bidest. um 50 bzw. 60 % abfielen.

3. Reihenfolge der Messungen; Enzymstabilität;

Die Reihenfolge der Tests wurde entsprechend der Labilität der einzelnen Enzyme gewählt. Unmittelbar anschließend an die Bereitung der Testsuspensionen bzw. -extrakte wurden die Aktivitäten der D-IDH, parallel dazu die der GP-Ox und SDH, danach noch am selben Versuchstag nacheinander CE, HAD, MDH und GOT bestimmt. GluDH, T-IDH und s-Pase -Tests sowie die Proteinbestimmung erfolgten am nächsten Tag nach Aufbewahrung der Proben bei -20°C . Bei den drei letzteren Enzymen ergab sich nach Einfrieren und Auftauen keine Aktivitätsänderung; während die übrigen Enzyme (außer SDH) Aktivitätsverluste bis unter 50 % der Ausgangsaktivität aufwiesen, zeigte die SDH Aktivitätssteigerungen auf ca. 110 %. Dies steht im Einklang mit den von GEAR [13] mitgeteilten Befunden, der die Stabilität einiger Enzyme nach Aufbewahrung der noch intakten isolierten Mitochondrien bei 0 bis -2°C bestimmte. KADENBACH [37] dagegen fand keinen merklichen Verlust der von ihm gemessenen Enzymaktivitäten nach Aufbewahrung der ebenfalls noch intakten Mitochondriensuspension über viele Tage in eingefrorenem Zustand.

4. Durchführung der einzelnen Enzymtests:

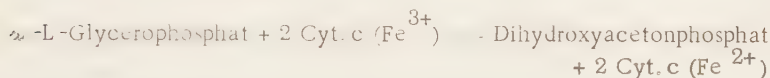
Die Lösungen von DPNH, Oxalacetat und α -Ketoglutarat wurden jeweils vor Versuchsbeginn frisch angesetzt; α -KG in 0.2 n NaOH gelöst. Die übrigen, mit Aqua bidest. bereiteten Lösungen wurden in eingefrorenem Zustand, die Puffer bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt. Je nach Aktivität des Enzyms wurden die unten angegebenen Extraktvolumina zum Teil variiert, und außerdem bei jeder Probe Proportionalitätstests durchgeführt. Die Messungen wurden als optische Tests unter standardisierten Bedingungen im Beckman DK -1A Doppelstrahl-Spektrophotometer (für GP-OX und SDH) bzw. im ebenfalls registrierenden Eppendorf-Photometer (Netheler und Hinz, Hamburg) für die übrigen Enzyme vorgenommen. Für die Berechnung der Enzymaktivitäten wurden folgende Extinctionskoeffizienten zugrunde

gelegt:

$$\begin{aligned} \text{DPNH, TPNH} &: \epsilon_{366 \text{ m}\mu} = 3,30 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol} \\ \text{Cytochrom c} &: \epsilon_{366 \text{ m}\mu} = 18,00 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol} \end{aligned}$$

Die Enzymaktivitäten wurden in 1 Mol umgesetztes DPNH (TPNH) bzw. DPN (TPN) oder Cytochrom c pro Stunde angegeben.

a. GP-Ox - Test 42



	Molarität im Test	Lösung	Testzusammensetzung
Phosphatpuffer pH 7,6	100 mM	200 mM	
mit EDTA	5 mM	10 mM	0,500 ml
KCN	1 mM	25 mM	0,040 ml
MgCl ₂	10 mM	200 mM	0,050 ml
α -L-Glycerophosphat	25 mM	500 mM	0,050 ml
Cytochrom c	0,08 mM	0,4 mM	0,020 ml
Suspension			0,200 ml
Aqua bidest, ad			1,000 ml

$$\lambda = 550 \text{ m}\mu \quad d = 1 \text{ cm} \quad t = 25^\circ \text{C}$$

Der Test wird jeweils doppelt angesetzt (in der Referenz-Kuvette ist das Substrat α -GP durch Aqua bidest ersetzt) und mit Cytochrom c gestartet. Dies geschah mit einer speziellen Zwillings-Startmaschine durch die beide Küvetteninhalte genau synchron mit der Startlösung durchmischt wurden. Die Differenz der Extinctionszunahmen von reduziertem Cytochrom c in beiden Küvetten wird im Doppelstrahl-Spektrophotometer direkt registriert.

d. SDH-Test 43



	Molarität im Test	Lösung	Testzusammensetzung
Phosphatpuffer pH 7.6	100 mM	200 mM	
mit EDTA	5 mM	10 mM	0.500 ml
KCN	1 mM	25 mM	0.040 ml
Succinat	20 mM	500 mM	0.020 ml
Cytochrom c	0.08 mM	0.4 mM	0.020 ml
Suspension			0.020 ml
Aqua bidest. ad			1.000 ml

$$\lambda = 550 \text{ m}\mu, \quad d = 1 \text{ cm}, \quad t = 25^\circ \text{C}.$$

Der Test wird doppelt angesetzt (in der Referenz-Küvette Succinat durch Aqua bidest. ersetzt) und mit Cytochrom c synchron gestartet. Durch die Messung im Doppelstrahl liefert dieses Testsystem Maximalwerte und Proportionalität. Bei Verwendung von Phenazinmethosulfat (PMS) als Elektronakzeptor [43] erhält man hierzu fast proportionale Aktivitäten, die durchschnittlich um den Faktor 2 höher liegen [44].

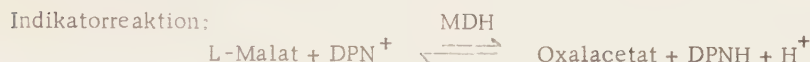
c. D-IDH - Test [41]



	Molarität im Test	Lösung	Testzusammensetzung
Phosphatpuffer pH 7.6	50 mM	100 mM	
mit EDTA	5 mM	10 mM	0.500 ml
DPN	3 mM	100 mM	0.030 ml
MgCl ₂	8 mM	400 mM	0.020 ml
ADP	2 mM	100 mM	0.020 ml
D-Isocitrat	0.8 mM	100 mM	0.010 ml
Extrakt			0.200 ml
Aqua bidest. ad			1.000 ml

$$\lambda = 366 \text{ m}\mu, \quad d = 1 \text{ cm}, \quad t = 25^\circ \text{C}.$$

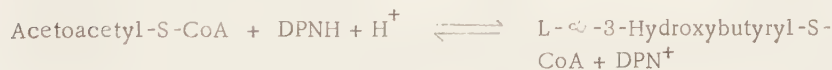
Der Test wird mit Isocitrat gestartet; die Zunahme der DPNH-Extinction wird registriert.

d. CE-Test [45]

	Molarität im Test	Lösung	Testzusammensetzung
Trispuffer pH 8,0 mit EDTA	100 mM 2,5 mM	200 mM 5 mM	0.250 ml
DPN	5 mM	100 mM	0.025 ml
L-Malat	60 mM	1000 mM	0.030 ml
Acetyl-S-CoA	0.3 mM	5 mM	0.030 ml
MDH	40 µg/ml	10 mg/ml	0.002 ml
Extrakt			0.020 ml
Aqua bidest. ad			0.500 ml

$\lambda = 366 \text{ m}\mu$; $d = 1 \text{ cm}$, $v = 0.5 \text{ ml}$ (Halbmikroküvette); $t = 25^\circ \text{C}$.

Nach dem Einpipettieren wird das Testgemisch zunächst ca. 3 min inkubiert, bis der Vorlauf zum Stillstand gekommen ist, und dann der Test durch Zugabe von Acetyl-CoA gestartet. Registriert wird die Zunahme der DPNH-Extinction.

e. HAD - Test [46]

TRA-Puffer pH 7,0 mit EDTA	100 mM 5 mM	200 mM 10 mM	0.250 ml
DPNH	0.4 mM	10 mM	0.020 ml
Acetoacetyl-S-CoA	0.12 mM	3 mM	0.020 ml
Extrakt			0.020 ml
Aqua bidest. ad			0.500 ml

$\lambda = 366 \text{ m}\mu$; $d = 1 \text{ cm}$, $v = 0.5 \text{ ml}$ (Halbmikroküvette); $t = 25^\circ \text{C}$.

Der Test wird mit Acetoacetyl-CoA gestartet und die Abnahme der DPNH-Extinction registriert.

f. MDH - Test [47]

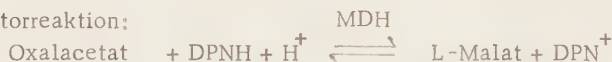
	Molarität im Test	Lösung	Testzusammensetzung
TRA-Puffer pH 7.6	50 mM	100 mM	
mit EDTA	5 mM	10 mM	0.500 ml
DPNH	0.3 mM	10 mM	0.030 ml
Oxalacetat	0.25 mM	10 mM	0.025 ml
Extrakt			0.020 ml
Aqua bidest. ad			1.000 ml

$\lambda = 366 \text{ m}\mu$, $d = 1 \text{ cm}$, $t = 25^\circ \text{C}$.

Der Test wird mit Oxalacetat gestartet und die Abnahme der DPNH-Extinction registriert.

g. GOT - Test [47]

Indikatorreaktion:



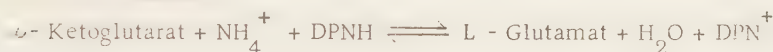
	Molarität im Test	Lösung	Testzusammensetzung
TRA-Puffer pH 7.6	50 mM	100 mM	
mit EDTA	5 mM	10 mM	0.500 ml
DPNH	0.3 mM	10 mM	0.030 ml
α -Ketoglutarat	5 mM	100 mM	0.050 ml
L-Aspartat	30 mM	1000 mM	0.030 ml
MDH	40 $\mu\text{g/ml}$	10 mg/ml	0.004 ml
Extrakt			0.020 ml
Aqua bidest. ad			1.000 ml

$\lambda = 366 \text{ m}\mu$, $d = 1 \text{ cm}$, $t = 25^\circ \text{C}$.

Bei Verwendung des hier angegebenen 100 mM TRA-EDTA-Puffer mit pH 7.6 gegenüber einem 200 mM Phosphat-EDTA-Puffer mit pH 7.3 - nach [47] - erhält man eine um 30 % höhere GOT-Aktivität. Veränderung des pH allein auf 7.6 (und Beibehaltung des Phosphatpuffers) führt ebenso wie Veränderung nur des Puffers (100 mM TRA-EDTA bei pH 7.3) zu jeweils ca. 10 % Aktivitätsverlust.

Der durch die gleichzeitig im Extrakt vorhandene GluDH bedingte Vorlauf wird zunächst gemessen und dann von der nach dem Start mit Aspartat gemessenen Aktivität subtrahiert. Registriert wird in beiden Fällen die Abnahme der DPNH-Extinction.

h. GluDH - Test [47]

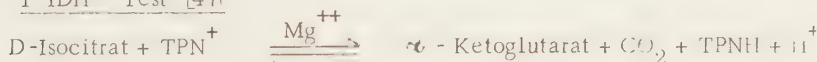


	Molarität im Test	Lösung	Testzusammensetzung
TRA-Puffer pH 7.6	50 mM	100 mM	
mit EDTA	5 mM	10 mM	0.500 ml
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	40 mM	400 mM	0.100 ml
DPNH	0.3 mM	10 mM	0.030 ml
α -Ketoglutarat	3 mM	100 mM	0.030 ml
ADP	2 mM	100 mM	0.020 ml
Extrakt			0.020 ml
Aqua bidest. ad			1.000 ml

$$\lambda = 366 \text{ m}\mu, d = 1 \text{ cm}, t = 25^\circ \text{C.}$$

ADP wird zur Aktivierung der GluDH [48] auf ungefähr doppelte Werte (Mittel aus 7 Versuchen: Steigerung um 92 % bei Typ-I-, um 124 % bei Typ-II-Mitochondrien) hinzugegeben. Der Start der Reaktion erfolgt mit α -Ketoglutarat; die Abnahme der DPNH - Extinction wird registriert.

i. T-IDH - Test [47]



	Molarität im Test	Lösung	Testzusammensetzung
TRA-Puffer pH 7.6	50 mM	100 mM	
mit EDTA	5 mM	10 mM	0.500 ml
und MgSO_4	8 mM	16 mM	
TPN	0.4 mM	20 mM	0.020 ml
D-Isocitrat	2 mM	80 mM	0.025 ml
Extrakt			0.050 ml
Aqua bidest. ad			1.000 ml

$$\lambda = 366 \text{ m}\mu, d = 1 \text{ cm}, t = 25^\circ \text{C.}$$

Der Test wird mit Isocitrat gestartet und die Zunahme der TPNH - Extinction registriert.

k. Saure-Phosphatase - Test [49]

p-Nitrophenylphosphat $\longrightarrow$ p-Nitrophenol + anorg. Phosphat

Testzusammensetzung:	Probe	Leerwert
50 mM Citratpuffer pH 5.0 mit 5.5 mM p-Nitrophenylphosphat	1.0 ml 5-10 min bei 37°C	1.0 ml temperieren
Extrakt	0.1 ml	-----
mischen und genau 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren		
Reaktionsstop durch 0.1 n NaOH	4.0 ml	4.0 ml
Extrakt	-----	0.1 ml
Aqua bidest. ad 10.0 ml	4.9 ml	4.9 ml
mischen, photometrieren gegen Leerwert bei $\lambda = 405 \text{ m}\mu$ und d = 1 cm.		

Die Menge des pro Zeiteinheit freigesetzten p-Nitrophenols, gemessen an der Extinction des im Alkalischen gelben p-Nitrophenolat-Anions, ist der Phosphatase-Aktivität direkt proportional. Die Umrechnung der gemessenen Extinctionen in diesen Umsatz ($U = \text{freigesetzte } \mu\text{Mol p-Nitrophenol/h} \times \text{ml eingesetzten Extraktes, bei } 37^\circ\text{C}$) erfolgte durch Multiplikation mit dem Faktor 21,0, der aus einer für die obigen Testbedingungen mit p-Nitrophenol aufgestellten Eichkurve gewonnen wurde.

VII. Bestimmung des Proteingehaltes:

Die Proteinbestimmung erfolgte in den desintegrierten, nicht abzentrifugierten und unverdünnten Mitochondrienhomogenaten (auch der D-IDH-Proben) bzw. den durch fraktionierte Extraktion gewonnenen Leberhomogenats-Überständen und -Suspensionen nach einer modifizierten Biuret-Methode [50]. Nach Fällung des Proteins mit 3 M Trichloressigsäure (0.4 M im Ansatz) und scharfer Zentrifugation wurden die Sedimente in je 2.5 ml konz. Biuret-Reagens gelöst und nach 30 min bei Zimmertemperatur gegen den Biuret-Leerwert bei $\lambda = 546 \text{ m}\mu$ und d = 2 cm photometriert. Infolge des Lipidgehaltes der Mitochondrien kommt es zu Trübungen der Biuret-Lösungen; daher wurde anschließend die Extinction dieser Trübung nach Zugabe einer Spatelspitze festen KCNs (dadurch wird der Biuret-Komplex zerstört) gemessen und von der Gesamttextinction subtrahiert. Der Proteingehalt der eingesetzten Probe wurde durch Multiplikation mit dem Faktor 4,375 berechnet.

VIII. Berechnung extramitochondrialer Enzymaktivitäten:

1. SDH - Faktor:

Die im Gesamthomogenat der Leber gemessenen spezifischen Enzymaktivitäten sind mit den in den isolierten Mitochondrien bestimmten spezifischen Aktivitäten trotz Bezug auf das jeweilige Gesamtprotein primär nicht vergleichbar, da die Isolierung der Mitochondrien aus dem Leberhomogenat nicht vollständig, d.h. quantitativ erfolgen kann. Um einen solchen Vergleich dennoch zu ermöglichen, wurde ein ausschließlich mitochondriales Enzym, die SDH, zusätzlich im Gesamthomogenat bestimmt. Das Verhältnis beider Werte, also

$$\frac{\text{spezif. SDH-Aktivität in den isol. Mitoch. (I + II)}}{\text{spezif. SDH-Aktivität im Leber-Gesamthomogenat}}$$

genannt, diente nun zur Umrechnung der extramitochondrial gemessenen Aktivitäten mehrörtiger Enzyme (T-IDH, MDH, GOT), die damit in direkte Beziehung zu ihren mitochondrialen Aktivitätsanteilen gesetzt werden konnten. Der SDH-Faktor betrug (im Mittel von 12 Versuchen) 4.13, stieg bei Hyperthyreose auf 4.9 und fiel bei hypothyreotem Status auf 3.6

2. Mitochondriengehalt der Leber:

Der reziproke Wert des obigen SDH-Faktors, also

$$\frac{\text{SDH / Gesamthomogenats-Protein}}{\text{SDH / Mitochondrienprotein I + II}} = \frac{\text{Mitochondrienprotein I + II}}{\text{Gesamtprotein}} \text{ gibt an}$$

Größen von 27.8, 24.2 und 20.4 % bei Hypo-, Eu- und Hyperthyreose Aufschluß über den Anteil des Mitochondrienproteins am Protein des 10%igen Leberhomogenats und damit am Gesamtgewebe und ist somit KLINGENBERGs Cytochrom-a-Faktor [51] analog. Bei einem aus 6 bis 12 repräsentativen Versuchen gemittelten Proteingehalt der Rattenleber von 180, 159 und 141 mg/g Gewebe in hypo-, eu- und hyperthyreotem Zustand berechnet sich damit in den betrachteten Versuchen das Mitochondrienprotein zu 50,0, 38,5 und 28,8 mg/g Leber. Das entspricht, jeweils wieder für Hypo-, Eu- und Hyperthyreose betrachtet, recht gut einem 5, 4 und 3 %igen Anteil des Gewichts des Mitochondrienproteins am Gewebsgewicht.

Da das Lebergewicht infolge seines besonders unter Thyreoidhormon schwankenden Wassergehaltes keine ideale Bezugsgröße darstellt, sind die oben angegebenen, auf den Proteingehalt des Gesamtgewebes bezogenen Werte

wohl genauer. Sie zeigen mit 278, 242 und 204 mg Mitochondrienprotein /g Leber-Gesamtprotein bei Hypo-, Eu- und Hyperthyreose auch geringere Thyreoidhormon-abhängige Schwankungen.

Keine Änderung des Mitochondriengehaltes der Leber unter dem Einfluß von Thyreoidhormon fand KADENBACH [37]. Er berechnete den Mitochondrien-gehalt jedoch aus den GluDH-Aktivitäten, die außerdem ohne Zusatz von ADP [46] gemessen wurden.

IX. Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse:

Die Berechnung der Standardabweichungen und Signifikanzen erfolgte nach den für Arbeiten an biologischem Material vereinfachten GAUSS-LAPLACE'schen Formeln:

$$\text{Standardabweichung des Mittelwertes: } s_M = \pm \frac{\sqrt{\frac{\sum x^2}{n-1}}}{\sqrt{n}} \quad \text{wobei:}$$

x = Abweichung des Einzelwerts vom Mittelwert
n = Zahl der Einzelwerte pro Versuchsreihe

$$\text{Standardabweichung von D: } s_D = \pm \sqrt{s_{M1}^2 + s_{M2}^2}$$

(D = Differenz der Mittelwerte M_1 und M_2 der beiden zu vergleichenden Versuchsreihen)

Daraus folgt die Berechnung der Abweichung t : $t = \pm D/s_D$

und der Zahl der Freiheitsgrade m:

$$m = n_1 + n_2 - 2.$$

Der für die Beurteilung der Signifikanz wichtige Probabilitätswert p kann nun für die jeweils berechneten Werte von t und m einer t-Verteilungstabelle, z.B. in [52], entnommen werden. Nach den in der Biologie üblichen Kriterien wurde auch in dieser Arbeit ein p von 0.05 als gerade noch ausreichend für das Vorliegen signifikanter Unterschiede angesehen.

Ergebnisse

I. Befunde an normalen (euthyreoten) Rattenlebermitochondrien:

1. Verteilung der Mitochondrien im Dichtegradienten.

Nach 50-minütiger Zentrifugation auf einem linearen Saccharose-Dichtegradienten fanden sich die Rattenlebermitochondrien im isopyknischen Gleichgewicht in zwei deutlich voneinander abgrenzbaren Banden. Dieses in steter Regelmäßigkeit zu verzeichnende Ergebnis der Zentrifugation zeigt in Abb. 5 die Photographie des Zentrifugenbechers. Die obere, im Dichtebereich von 1.16 lokalisierte schmalere Bande enthält die leichteren, in dieser Arbeit als "Typ I" bezeichneten Mitochondrien; die untere breite Bande enthält im Dichtebereich von 1.18 die hier "Typ II" genannten schweren Mitochondrien.

2. Verteilung von Enzymaktivitäten im Dichtegradienten:

Die Verteilung mitochondrialer Enzyme im Dichtegradienten zeigt am Beispiel der SDH und der GP-Ox die Abb. 6. Relative Enzymaktivitäten (s. S. 27) und Proteinkonzentrationen wurden in fortlaufend aus dem Gradienten entnommenen Fraktionen gleichen Volumens bestimmt und in der Ordinate aufgetragen, in der Abszisse die Nummern der einzelnen Fraktionen entsprechend der Abnahme der Dichte. Auch hier kommt, wie in Abb. 5 bereits zu erkennen ist, die Auftrennung in zwei Fraktionen klar zum Ausdruck. Sowohl der Verlauf der Proteinkonzentrationen als auch die Aktivitätskurven von SDH und GP-Ox sind zweigipflig. Bemerkenswert ist die gute Übereinstimmung der Proteinmaxima mit den Maxima der beiden Enzymaktivitäten. Da beide Enzyme typisch mitochondriale Komponenten sind, besagt dies, daß den Maxima der Proteinkurve im wesentlichen mitochondriale Proteine zugrunde liegen. Tatsächlich zeigt die Verteilungskurve eines nicht in den Mitochondrien lokalisierten Enzyms, der in erster Linie in den um einiges leichteren Lysosomen vorhandenen sauren Phosphatase [53] (Abb. 7), nicht nur andere Maxima, sondern auch den Hauptanteil der Aktivität erst in den obersten Fraktionen des Gradienten. Dies entspricht der zu erwartenden Äquilibrierung lysosomaler Verunreinigungen in den Gradientenbereichen geringerer Dichte.

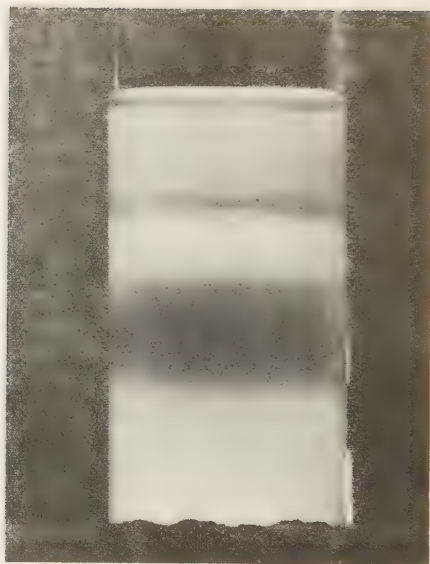


Abb. 5

Abb. 5; Photographie des beschickten Dichtegradienten nach 50 min-Zentrifugation bei 100 000 x g im Ausschwingrotor:

obere Bande = Typ-I-Mitochondrien

untere Bande = Typ-II-Mitochondrien.

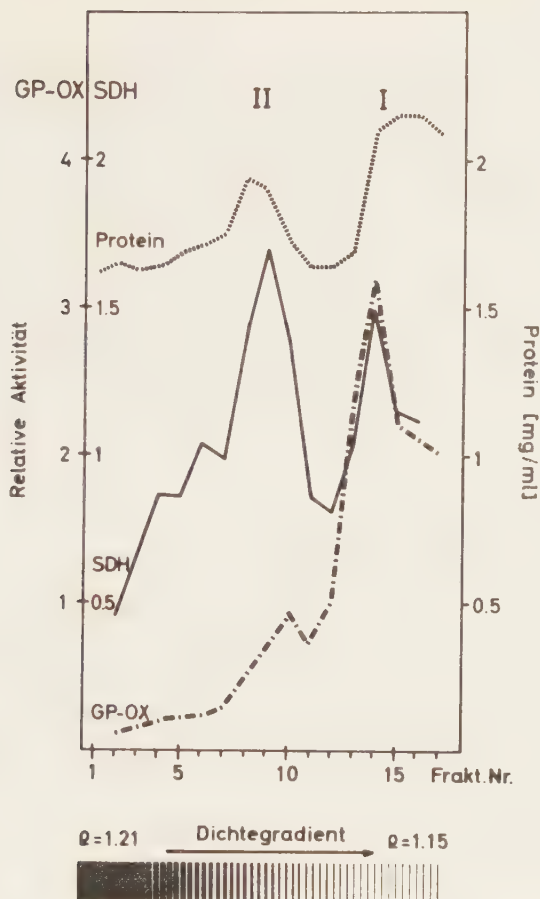


Abb. 6

Abb. 6: Verteilung der SDH und GP-Ox sowie des Proteins im Dichte - gradienten, der fortlaufend in 17 Fraktionen gleichen Volumens zerlegt wurde.

Sie sind, entsprechend der Abnahme der Dichte, in der Abszisse aufgetragen; die Ordinate zeigt die relativen Enzymaktivitäten sowie den Proteingehalt der einzelnen Fraktionen.

Relative Aktivität = spezifische Aktivität der betreffenden Fraktion bezogen auf den Mittelwert aus den spezifischen Aktivitäten aller Fraktionen.

Nach Angaben in der Literatur [54] dürfte die obere Bande des Gradienten ebenfalls stärker mit Bestandteilen des endoplasmatischen Reticulums verunreinigt sein. Da somit absolute Enzymaktivitäten auf Proteinbasis keine verlässlichen Aussagen gestatten, ist es besser, die Verhältnisse von SDH und GP-Ox in den beiden Maxima zu betrachten. Die auffallend unterschiedliche Höhe der relativen Aktivitäten von SDH und GP-Ox in den beiden Proteinmaxima (Abb. 6) läßt große Differenzen im Aktivitätsquotienten GP-Ox/SDH erwarten. In der direkten Auftragung dieses Quotienten GP-Ox/SDH in den einzelnen Fraktionen (Abb. 8) umspannen diese Unterschiede den Bereich einer Größenordnung. Verständlicherweise sind Unterschiede des Quotienten in diesem Ausmaß nicht zu erwarten, wenn die Trennung der beiden Mitochondrientypen in größeren Fraktionen, also präparativ erfolgt.

3. Enzymatische Analyse und Proteingehalt der isolierten Mitochondrien vom Typ I und II:

Bei der präparativen Isolierung der beiden Mitochondrientypen wurden aus dem Gradienten zwei größere Fraktionen getrennt entnommen, die im wesentlichen die in den Abb. 6 bis 8 als I und II bezeichneten Gipfel bzw. die Mitochondrien vom Typ I und II enthalten.

In diesen Fraktionen liegen die spezifischen Aktivitäten der SDH der Typ-I-Mitochondrien etwa um den Faktor 3 niedriger als in Typ II. Umgekehrt liegen die spezifischen Aktivitäten der Typ-I-Mitochondrien für GP-Ox fast um das Doppelte über denen der Typ-II-Mitochondrien. Die Aktivitätsquotienten GP-Ox/SDH in den beiden Fraktionen variieren um den Faktor 5.

Diese an durch Dichtegradientenzentrifugation isolierten Mitochondrien gemessenen Werte, die das Mittel aus 15 Versuchen darstellen, stimmen mit Meßwerten von Mitochondrien, die mit Differentialzentrifugation gewonnen wurden, recht gut überein. Beide Methoden sind für die Isolierung der unterschiedlichen Mitochondrientypen geeignet.

Die Absolutmengen des aus dem Dichtegradienten in den beiden Fraktionen isolierten Mitochondrienproteins vom Typ I und II zeigt die Tabelle in Abb. 9. Ihre mittlere Reihe (Euthyrese) bringt zahlenmäßig klar zum Ausdruck, was schon in der Abb. 5 angedeutet zu erkennen ist: daß die Typ-I-Mitochondrien mengenmäßig etwa den vierten Teil der Mitochondrien vom Typ II ausmachen; d. h., ihr Anteil am gesamten isolierten Mito-

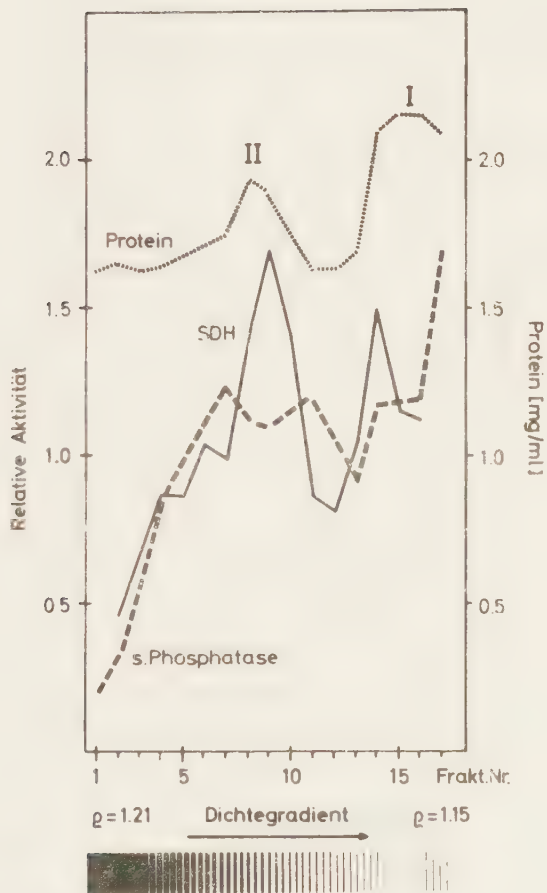


Abb. 7: Verteilung der s-Pase im Dichtegradienten der Abb. 6. SDH und Protein sind zum Vergleich miteingezeichnet. Relative Aktivitäten wie in Abb. 6.

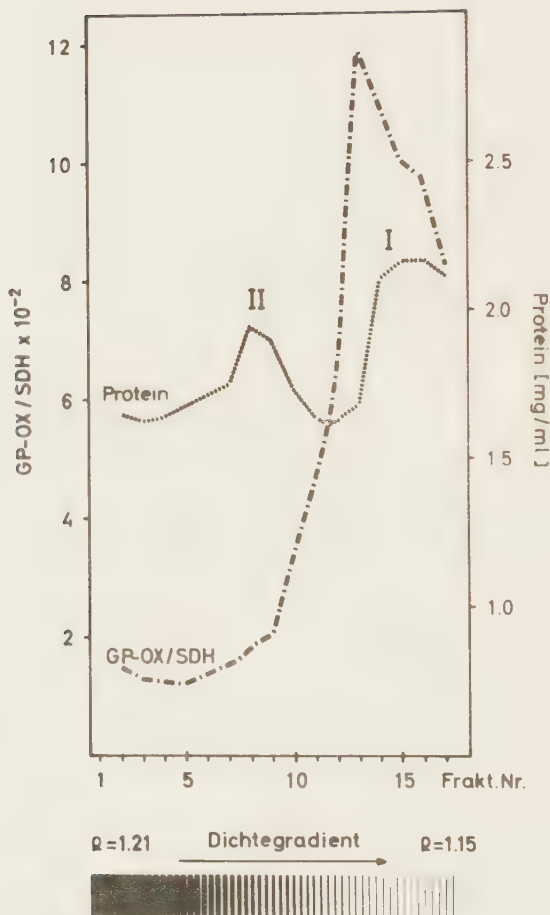


Abb. 8: Verlauf des Aktivitätsquotienten GP-Ox/SDH im Gradienten der Abb. 6. Protein ist zum Vergleich miteingezeichnet.

chondrienprotein beläuft sich auf rund 20 %. Wie oben bereits vermerkt, kann die Isolierung und Auftrennung der Mitochondrien in zwei hauptsächliche Fraktionen besonders bei der Dichtegradientenzentrifugation nie quantitativ vollständig erfolgen. Daher liegen die Werte der Abb. 9 verständlicherweise beträchtlich unter den über den sog. SDH Faktor (s. 23) berechneten Werten des Mitochondriengehaltes der Rattenleber. Die "Ausbeute" an mitochondrialem Protein beträgt bei der hier betrachteten Methodik ca. 20 %.

Eine enzymatische Analyse der beiden Mitochondrientypen in Gestalt von Enzymaktivitätsmustern [55, 34] ist in Abb. 10 wiedergegeben. Die in den beiden Mitochondrienhomogenaten gemessenen Aktivitäten wurden auf das betreffende mitochondriale Gesamtprotein bezogen und in logarithmischem Maßstab mit den Abkürzungen der Enzymnamen aufgetragen. Es

	Protein TYPI	Protein TYPII	gesamtes Mitoch. Protein TYP I + II		Anteil v. TYPI am gesamten Mitoch. Protein
	mg/g Leber	mg/g Leber	mg/g Leber	mg/g Leberprot.	
hyperthyreot	1.3	3.8	5.1	34.5	25.5 %
euthyreot	1.5	5.8	7.3	43.2	21.5 %
hypothyreot	1.7	7.8	9.5	50.5	18.0 %

Abb. 9

Aus dem Dichtegradienten isoliertes Mitochondrienprotein beider Typen bei Hyper-, Eu- und Hypothyreose. Isolierung mittels Fraktioniermaschine im Anhubverfahren. Verzeichnet sind die Mittelwerte aus 7 Versuchen.

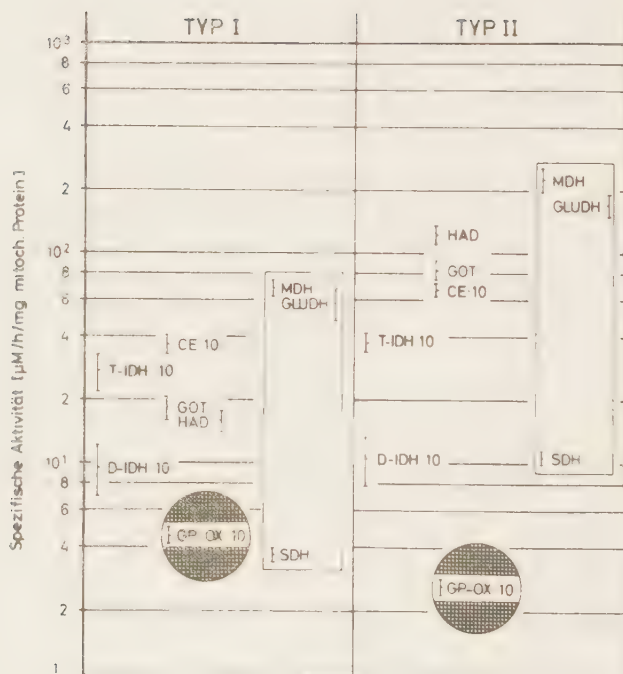


Abb. 10: Enzymaktivitätsmuster von Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien der normalen, euthyreoten Rattenleber. Die in den durch Dichtegradientenzentrifugation isolierten Mitochondrientypen in standardisierten optischen Tests gemessenen Enzymaktivitäten wurden auf das betreffende mitochondriale Protein bezogen und mit den Abkürzungen ihrer Namen in logarithmischem Maßstab aufgetragen. Die einzelnen Aktivitäten stellen die Mittelwerte aus 9 bis 16 Versuchen dar und sind mit den Grenzen ihrer Standardabweichungen vom Mittelwert eingezeichnet.

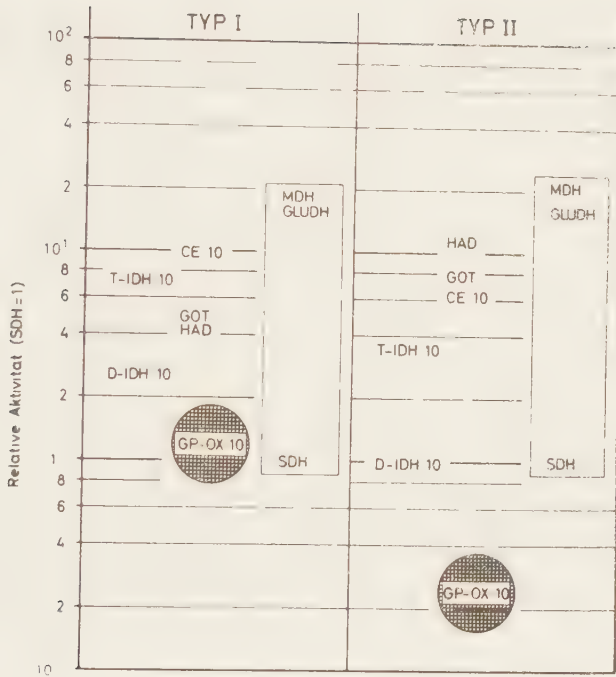


Abb. 11: Enzymaktivitätsmuster wie in Abb. 10.

Die Aktivitäten der einzelnen Enzyme sind in dieser Darstellung auf die jeweilige Aktivität der SDH bezogen (SDH = 1).

handelt sich dabei um die aus 9 bis 16 repräsentativen Versuchen ermittelten Durchschnittswerte. Die einzelnen Aktivitäten sind mit den Grenzen ihrer Standardabweichungen vom Mittelwert eingezeichnet.

Außer den bereits erörterten Unterschieden der strukturgebundenen Enzyme SDH und GP-Ox tritt die Verschiedenartigkeit der beiden Mitochondrientypen namentlich am Beispiel bestimmter "löslicher" Enzyme deutlicher zutage. Mit Ausnahme der GP-Ox übertreffen die spezifischen Aktivitäten aller untersuchten Enzyme in Typ II diejenigen in Typ I.

Dem Vergleich der Enzymaktivitäten kommt noch größere Aussagekraft zu durch die Wahl einer anderen, spezifischeren Bezugsgröße. Da, wie schon oben (S. 28) erwähnt, die beiden Mitochondrienfraktionen in unterschiedlichem Maße mit Fremdprotein verunreinigt sind, wurden in Abb. 11 für beide Mitochondrientypen die Enzymaktivitätsmuster auf der Skala der relativen Aktivität dargestellt. Zu diesem Zweck wurden die Aktivitäten aller übrigen Enzyme auf die Aktivität der SDH bezogen, die in beiden Mustern gleich 1 gesetzt wurde.

Durch die logarithmische Auftragung sind die Proportionen der Aktivitätsgehalte direkt in den Abständen ablesbar. Deutlich erkennbar ist die bereits aus der vergleichenden Analyse von Mitochondrien verschiedener Gewebe [32, 33, 34] bekannte Proportionskonstanz von MDH zu SDH. Gleiches trifft anscheinend auch für die Aktivitäten der GluDH in den beiden Mitochondrientypen der Leber zu. Unterschiede in den relativen Aktivitäten können für HAD, GOT, CE, die beiden Isocitrat-Dehydrogenasen und, wie bereits erwähnt, für die GP-Ox verzeichnet werden. Dabei liegen die relativen Aktivitäten der HAD und der GOT in den Typ-II-Mitochondrien höher, während umgekehrt die Typ-I-Mitochondrien durch höhere relative Aktivitäten des CE, der T-IDH, D-IDH und der GP-Ox charakterisiert sind.

Gerade diese Unterschiede, die in den einander gegenübergestellten Enzymaktivitätsmustern so deutlich werden, weisen die Verschiedenartigkeit der beiden Mitochondrientypen sowohl an löslichen als auch an strukturgebundenen Enzymen aus.

4. Intaktheit der isolierten Mitochondrien:

Die für beide Typen verzeichnete Proportionskonstanz von MDH bzw. GluDH zur SDH ist schließlich ein wichtiges Argument für die Feststellung, daß es sich in beiden Fällen um größtenteils intakte Mitochondrien und

nicht um Bruchstücke, also Artefakte handelt.

Für die leichten Mitochondrien vom Typ I wäre dieser Einwand nach ihrem Verhalten bei der Dichtegradientenzentrifugation möglicherweise berechtigt, da im Homogenisator zerstörte Mitochondrien im hier verwandten Saccharosegradienten überhaupt nicht oder allenfalls nur sehr gering sedimentieren. Daß es sich bei den Typ-I-Mitochondrien aber tatsächlich um vorwiegend intakte Partikel handelt, zeigt die Abb. 12:

In diesem Versuch wurden Enzymaktivitäten von Mitochondrien des Typs I nach Isolierung auf dem Dichtegradienten und nach zusätzlicher mehrfacher Waschung in 0,3 M Saccharosemedium miteinander verglichen. Für die gemessenen Enzyme finden sich in gewaschenen wie in ungewaschenen Mitochondrien identische Aktivitäten. Im Gegensatz dazu stehen die Werte der rechten Spalte der Abbildung. Sie zeigt das Enzymaktivitätsmuster von Mitochondrienfragmenten des Typs I. Die Mitochondrien wurden nach der Isolierung über den Dichtegradienten im Homogenisator desintegriert und anschließend dreimal gewaschen. Während in diesen Fragmenten die konstante Proportion der beiden Strukturgebundenen Enzyme SDH und GP-Ox unverändert besteht, sind die Aktivitäten der löslichen Enzyme MDH und GluDH, wie zu erwarten, durch Auslaufen um mehr als eine Größenordnung verringert, - und dies, obwohl z.B. die GluDH durch Saccharosemedium nur sehr schwer von mitochondrialen Membranfragmenten zu entfernen ist.

Aus dem Dichtegradienten isolierte Typ I Mitochondrien

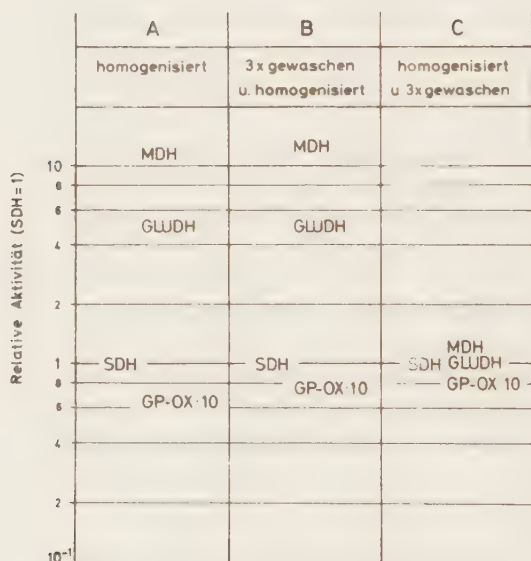


Abb. 12: Enzym-Muster relativer Aktivitäten (SDH = 1) in Typ-I-Mitochondrien derselben Präparation:

A: nach Isolierung aus dem Dichtegradienten.

B: nach zusätzlicher 3-facher Waschung in 0.3 M Saccharosemedium.

C: nach mechanischer Zertrümmerung und 3-facher Waschung in 0.3 M Saccharosemedium.

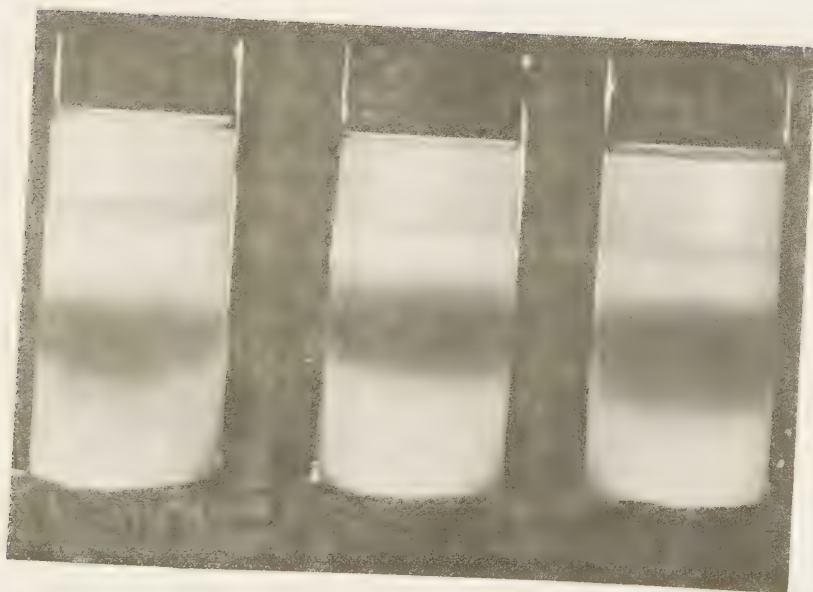


Abb. 13: Auftrennung von Rattenlebermitochondrien bei Hypothyreose (links), Euthyreose (Mitte) und Hyperthyreose (rechts). Die Mitochondrien wurden in parallel geführten Versuchsansätzen isoliert und im selben Zentrifugationsgang (50 min bei 100 000 x g im Ausschwingrotor) aufgetrennt: obere Bande = Typ-I-Mitochondrien; untere Bande = Typ-II-Mitochondrien. Erkennbar ist die entgegengerichtete Verschiebung beider Banden unter dem Einfluß des Thyreoidhormons.

II. Einflüsse von Hyper- und Hypothyreose auf beide Mitochondrientypen.

Weitere Kriterien für die Verschiedenartigkeit beider Mitochondrientraktio-nen stellen Befunde dar, die unter dem Einfluß exogen veränderter Thyreoid-hormonspiegel gewonnen wurden.

1. Lokalisation im Dichtegradienten:

Hyper- und auch hypothyreote Rattenlebermitochondrien weisen nach er-folgter Dichtegradientenzentrifugation im Vergleich zu euthyreoten Mito-chondrien eine geringfügig, jedoch ganz regelmäßig veränderte Lokalisation ihrer Banden auf.

Abb. 13 zeigt die Photographie der Zentrifugenbecher von parallel isolier-ten und im selben Zentrifugationsgang über gleiche Gradienten aufgetrenn-ten hypo-, eu- und hyperthyreoten Rattenlebermitochondrien. Bei Hypo-thyreose findet sich die obere Bande mit den Typ-I-Mitochondrien etwas oberhalb, die untere Bande der Typ-II-Mitochondrien etwas unterhalb der entsprechenden Positionen bei Euthyreose (jeweils die Mitte der einzelnen Banden gerechnet). Bei Hyperthyreose dagegen liegt die obere Bande tiefer, die untere höher als bei Euthyreose. Den Mitten der einzelnen Banden ent-sprechen folgende Dichtebereiche: Typ I: $\rho = 1.163, 1.164$ und 1.165 ; Typ II: $\rho = 1.173, 1.178$ und 1.183 , jeweils bei Hypo-, Eu- und Hyperthyreose.

Dieses inverse Verhalten von Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien im Dichte-gradienten unter dem Einfluß von Thyreoidhormon deutet die Eigenständig-keit beider Typen lediglich an. Weiterhin zeigt es, daß durch Hypo- bzw. Hyperthyreose Dichte und Zusammensetzung der Mitochondrien gegensinnig und ungefähr linear beeinflußt werden [37]

Daß Thyroxin-induzierte Mitochondrien einen höheren Membrananteil, damit auch mehr Lipide besitzen und deshalb im Gradienten (wie hier der Typ II) etwas höher äquilibrieren, wurde von LUCK [56] beschrieben. Damit stimmt die oben (S. 35) angeführte Beobachtung überein, derzufolge isolierte Mitochondrienmembranen in dem verwendeten Gradienten über-haupt nicht sedimentieren.

2. Menge des isolierten Mitochondrienproteins:

In diesem Zusammenhang sind die Thyreoidhormon-abhängigen Veränderungen der Proteinmengen der isolierten Mitochondrien vom Typ I und II, wie sie die Tabelle in Abb. 9 zeigt, von Interesse. Vom hypo- zum hyperthyreoten Status sinkt die Ausbeute an mitochondrialem Protein für beide Typen, wobei der Abfall des isolierten Mitochondrienproteins im Typ II wesentlich ausgeprägter ist. Infolgedessen wächst auch der in der letzten Spalte der Tabelle verzeichnete Anteil des Typs I am Gesamt-Mitochondrienprotein unter Thyreoidhormon von 18 auf über 25 %, obwohl gleichzeitig die Menge des gesamten pro g Leber isolierten Mitochondrienproteins fast um die Hälfte abnimmt. Diese Abnahme des isolierten Mitochondrienproteins unter der Wirkung des Thyreoidhormons zeigt fast im selben Umfang auch das aus dem sog. SDH-Faktor berechnete Mitochondrienprotein (S. 23). Sie wird durch Bezug auf das jeweilige Leber-Gesamtprotein nur um weniges ausgeglichen und ist daher nur zum Teil mit der wechselnden Durchsäftung des Leberparenchyms zu erklären.

3. Enzymaktivitätsmuster:

Abb. 14 richtet das Augenmerk auf Thyreoidhormon-abhängige Bewegungen in den Enzymaktivitätsmustern der beiden Mitochondrientypen. Jeweils für Typ I und II sind die Muster der spezifischen Enzymaktivitäten in hypo- eu- und hyperthyreotem Status der Versuchstiere nebeneinander gestellt. Verzeichnet sind die Mittelwerte aus 4 bis 16 repräsentativen Versuchen (vgl. Abb. 15) und deren Standardabweichungen.

Folgende Befunde sind aus den Mustern zu entnehmen:

- a. In beiden Mitochondrienarten nehmen die Aktivitätsgehalte aller Enzyme unter Thyreoidhormon zu. Dies entspricht im wesentlichen der von verschiedenen Autoren, insbesondere von KADENBACH [37], beschriebenen Enzyminduktion.
- b. Unterschiedlich ist in beiden Mitochondrientypen aber das Ausmaß der Aktivitätsanstiege zwischen hypo- und hyperthyreotem Zustand. Sowohl strukturgebundene als auch lösliche Enzyme werden in Typ I stärker induziert bzw. reprimiert als in Typ II. Eine Ausnahme bilden dabei vor allem die GP-Ox und die DPN-spezifische IDH.

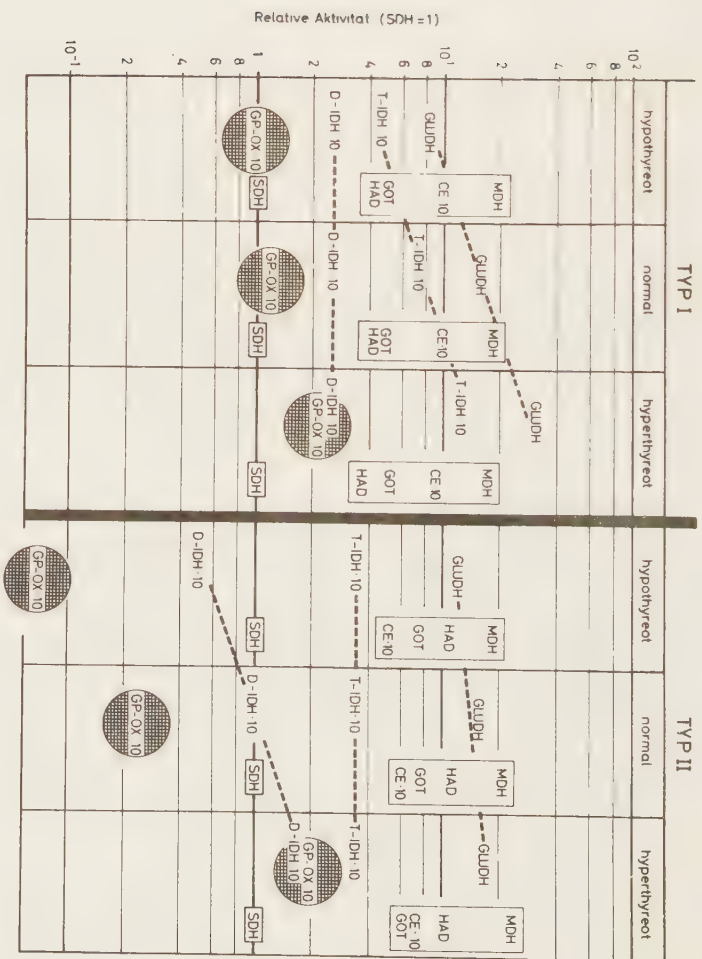


Abb. 14: Enzymaktivitätsmuster von Rattenlebermitochondrien des Typs I und II in hypo-, eu- und hyperthyreotem Zustand. Die Enzyme sind mit ihren spezifischen Aktivitäten als Mittelwerte aus 4 bis 16 Versuchen unter Angabe der Standardabweichungen angegeben.

		Spezifische Aktivität Mittel aus n Messungen [$\mu\text{M} / \text{ml} \times \text{mg} \text{ mitochond. Protein}]$		Messungen	Probabilität TYP II - TYP I	Signifikanz TYP II - TYP I
		TYP I	TYP II	n	p	s
D-IDH	hyper	1.33	2.5	9	< 0.05	+
	eu	0.95	1.05	15	> 0.05	-
	hypo	0.68	0.47	9	< 0.01	++
T-IDH	hyper	7.0	4.65	9	> 0.05	-
	eu	2.72	3.75	16	> 0.05	-
	hypo	1.2	3.27	9	< 0.001	+++
GLUDH	hyper	175	237	9	> 0.05	-
	eu	58	171	15	< 0.001	+++
	hypo	21.6	113	9	< 0.001	+++
MDH	hyper	96.7	329	6	< 0.001	+++
	eu	68	225	12	< 0.001	+++
	hypo	50	174	7	< 0.001	+++
GOT	hyper	28.8	92	6	< 0.001	+++
	eu	18.2	83.5	12	< 0.001	+++
	hypo	12.1	70.6	7	< 0.001	+++
HAD	hyper	21	145	4	< 0.05	+
	eu	15.8	123	9	< 0.001	+++
	hypo	11.7	102	6	< 0.001	++
CE	hyper	5.1	10.2	4	< 0.05	+
	eu	3.66	6.7	9	< 0.001	+++
	hypo	2.58	4.86	6	< 0.01	++
GP-ox	hyper	1.3	2.77	9	< 0.001	+++
	eu	0.445	0.255	15	< 0.001	+++
	hypo	0.252	0.064	9	< 0.001	+++
SDH	hyper	5.6	13.8	9	< 0.001	+++
	eu	3.7	10.7	15	< 0.001	+++
	hypo	2.6	9.3	9	< 0.001	+++

Abb. 15: Enzymaktivitäten von Rattenlebermitochondrien des Typs I und II in hyper-, eu- und hypothyreotem Status sowie statistische Signifikanz ihrer Unterschiede in den beiden Mitochondrientypen.

Für beide Enzyme wird im Typ II zwischen hypo- und hyperthyreotem Status ein wesentlich stärkerer Anstieg verzeichnet.

- c. Der in den Typ-I-Mitochondrien stärkere Anstieg der meisten Enzyme unter Thyroxin bringt es mit sich, daß die bereits im euthyreoten Zustand (s. o. Abb. 10) zwischen beiden Mitochondrientypen festgestellten Unterschiede in den Enzymaktivitäten bei Hypothyreose am deutlichsten zutage treten. Dies zeigt auch die Tabelle der Abb. 15, in der die p-Werte der Differenz der jeweiligen Enzymaktivitäten in Typ I und II berechnet sind. Wie ganz leicht der letzten Spalte der Tabelle zu entnehmen ist, sind die Unterschiede zwischen beiden Typen bei Hypothyreose statistisch durchweg am höchsten signifikant. Die teilweise vorhandene Nicht-Signifikanz bei D-IDH, T-IDH und GluDH, die in erster Linie durch ähnliche Absolutgrößen der verglichenen Aktivitäten bedingt ist wird durch die gerade bei diesen drei Enzymen (und bei der GP-Ox) in Typ I und II so unterschiedlichen Thyreoidhormon-abhängigen Bewegungen, wie sie die Abb. 14 zeigt, völlig ausgeglichen.
 - d. Die unterschiedlichen Enzymbewegungen werden sehr auffällig, wenn man die Aktivitäten aller untersuchten Enzyme wieder auf diejenige der SDH bezieht. Das ist im Muster der Abb. 16 geschehen; die SDH-Aktivitäten sind hier gleich 1 gesetzt. Zunächst ist die in allen Thyreoidstaten und bei beiden Mitochondrientypen zu erkennende annähernde Konstanz der relativen Aktivitäten der MDH hervorzuheben. Dies bedeutet, daß die in den Mitochondrien verschiedenster Gewebe festgestellte Proportionskonstanz der Citrat-cyclus-Enzyme [32, 33, 34] wie MDH und SDH nicht nur, wie bereits erwähnt, in den beiden Mitochondrientypen, sondern darüber hinaus auch bei Hypo- und Hyperthyreose erhalten bleibt. Dieser letzte Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von KADENBACH³⁷ der beträchtliche Veränderungen konstanter Proportionen unter dem Einfluß von Thyreoidhormon beschrieb.
- In bezug auf den bereits vermerkten stärkeren Anstieg der D-IDH vom hypo- zum hyperthyreoten Zustand in den Typ-II-Mitochondrien ist hier die relativ geringe Aktivitätszunahme der TPN-spezifischen IDH auffällig. Genau umgekehrte Verhältnisse gelten für die Aktivitäten der beiden Isocitrat-Dehydrogenasen in den Typ-I-Mitochondrien. Hier ist nicht das DPN-, sondern das TPN-spezifische Enzym durch stärkere Aktivitätszunahme ausgezeichnet. Insofern verhalten sich D-IDH und T-IDH in den beiden Mitochondrientypen entgegenge-

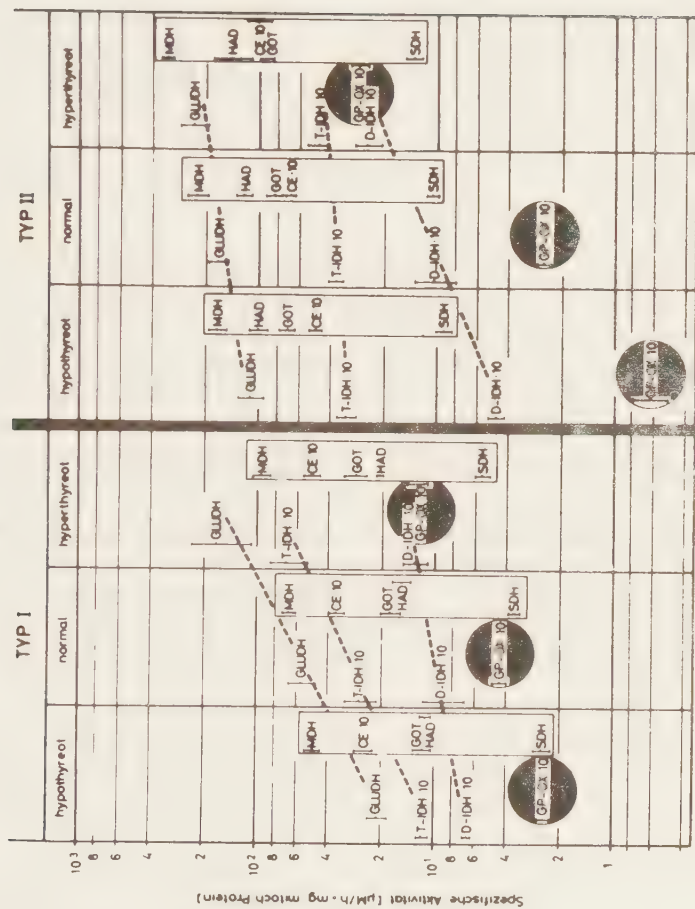


Abb. 16 Enzymaktivitätsmuster, wie in Abb. 14. Die Aktivitäten der einzelnen Enzyme sind in dieser Darstellung auf die jeweilige Aktivität der SDH bezogen (SDH = 1).

setzt. Ein stärkerer Anstieg der einen Isocitrat-Dehydrogenase ist jeweils mit einem schwächeren Anstieg der anderen Isocitrat-Dehydrogenase vergesellschaftet.

Dieses Phänomen findet seinen zahlenmäßigen Ausdruck in der jeweiligen Größe des sog. T-IDH/D-IDH-Quotienten in beiden Mitochondrienarten. Er fällt, wie die Tabelle der Abb. 17 deutlich zeigt, im Typ I ausgehend vom hypothyreoten Status auf ungefähr ein Drittel des Ausgangswertes ab, während im Typ II genau umgekehrt ein Anstieg auf mehr als das Dreifache zu verzeichnen ist. Der hier für Euthyreose berechnete Normalwert des Quotienten von rund 3 in beiden Mitochondrientypen liegt etwas über den von GOEBELL und KLINGENBERG [57] mit 2.1 bzw. von GEAR [13] mit 1.5 für Gesamt-Mitochondrien der Rattenleber angegebenen Werten des T-IDH/D-IDH-Quotienten.

Die in beiden Mitochondrientypen unter dem Einfluß des Thyreoidhormons beobachteten Bewegungen der Gehalte an D-IDH und T-IDH stehen zum Teil in Diskrepanz mit den von KADENBACH [37] mitgeteilten Befunden. Im Gegensatz zu diesem Autor, der bei steigender Thyreoidhormon-Dosierung über einen Abfall des Gehaltes an T-IDH berichtete, wurde in den eigenen Untersuchungen sowohl in den Typ-I- als auch in den Typ-II-Mitochondrien ein Anstieg der T-IDH-Aktivität festgestellt. Da dieser Anstieg, wenn auch in unterschiedlichem Maße, in beiden Mitochondrientypen erfolgt, kann die erwähnte Diskrepanz nicht dadurch erklärt werden, daß die KADENBACH'schen Befunde an einer nicht nach unterschiedlichen Typen differenzierten Mitochondrienpopulation erhoben wurden. Übrigens können die hier mitgeteilten Befunde auch nicht den von KADENBACH [37] herausgestellten Abfall der mitochondrialen GOT unter dem Einfluß von Thyreoidhormon

	hyperthyreot	euthyreot	hypothyreot
Typ I	5.3	2.9	1.8
Typ II	1.9	3.5	7.0

Abb. 17: Aktivitätsquotienten T-IDH/D-IDH in Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien der Rattenleber in hypo-, eu- und hyperthyreotem Status. Der Berechnung liegen die Werte aus der Abb. 15 zugrunde.

bestätigen. Abb. 14 zeigt, daß der Aktivitätsgehalt an GOT in beiden Mitochondrientypen unter dem Einfluß steigender Thyreoidhormon-Dosierung zunimmt.

- e. Eine weitere Besonderheit, die aus der Analyse der Abb. 14 und 16 folgt, ist eine unverkennbare Parallelität zwischen den Bewegungen der Aktivitätsspiegel von GluDH und T-IDH. Der T-IDH entsprechend ist demnach auch der Aktivitätsanstieg der GluDH in den Typ-I-Mitochondrien stärker als in Typ II.

4. Induzierbarkeit der einzelnen Enzyme:

Werden die Aktivitätsgehalte im hypo- und hyperthyreoten Status auf den euthyreoten Zustand bezogen, so treten die unterschiedlichen Bewegungen der Enzymaktivitäten in den beiden Mitochondrientypen noch deutlicher hervor. In Abb. 18 ist diese Analyse durchgeführt. Für die untersuchten 9 Enzyme wurden die Aktivitätsgehalte im Normzustand (Euthyreose) gleich 1 gesetzt. Darauf bezogen wurden die Anstiege bzw. Abnahmen der Enzymaktivitäten in logarithm. einem Maßstab als Säulen dargestellt. Zwei Gruppen von Enzymen können unterschieden werden:

- a. Im Falle der DPN-spezifischen IDH, GP-Ox und in geringem Maße auch der MDH und des CE zeigen sich durchweg stärkere Zu- bzw. Abnahmen der Aktivitäten in den Typ-II-Mitochondrien.
- b. Im Falle der TPN-spezifischen IDH, GluDH, GOT, HAD und SDH sind die Bewegungen der Aktivitäten bezogen auf den Normzustand ausgeprägter in den Typ-I-Mitochondrien.

Viel klarer als in den Enzymaktivitätsmustern der vorausgegangenen Abbildungen 14 und 16 zeigt sich in dieser Darstellung die für beide Mitochondrientypen unterschiedliche Induzierbarkeit der verschiedenen Enzyme. Krass ist das Beispiel der beiden strukturgebundenen Dehydrogenasen. Vom hypo- zum hyperthyreoten Status steigt die Aktivität der GP-Ox im Typ I um den Faktor 5 und im Typ II um den Faktor 43 ! Die SDH-Aktivität steigt in den Typ-II-Mitochondrien um das 1,5-fache, in den Typ-I-Mitochondrien um mehr als das Doppelte an.

Nicht minder auffällig ist das Verhalten der beiden Isocitrat-Dehydrogenasen; Neben dem bereits erörterten Unterschied ihrer Induzierbarkeit in den beiden Mitochondrientypen fällt auf, daß der Aktivitätszuwachs vom euthyreoten Zustand ausgehend in beiden Mitochondrientypen quantitativ das gleiche Ausmaß erreicht, wenn beide Enzyme zusammen betrachtet

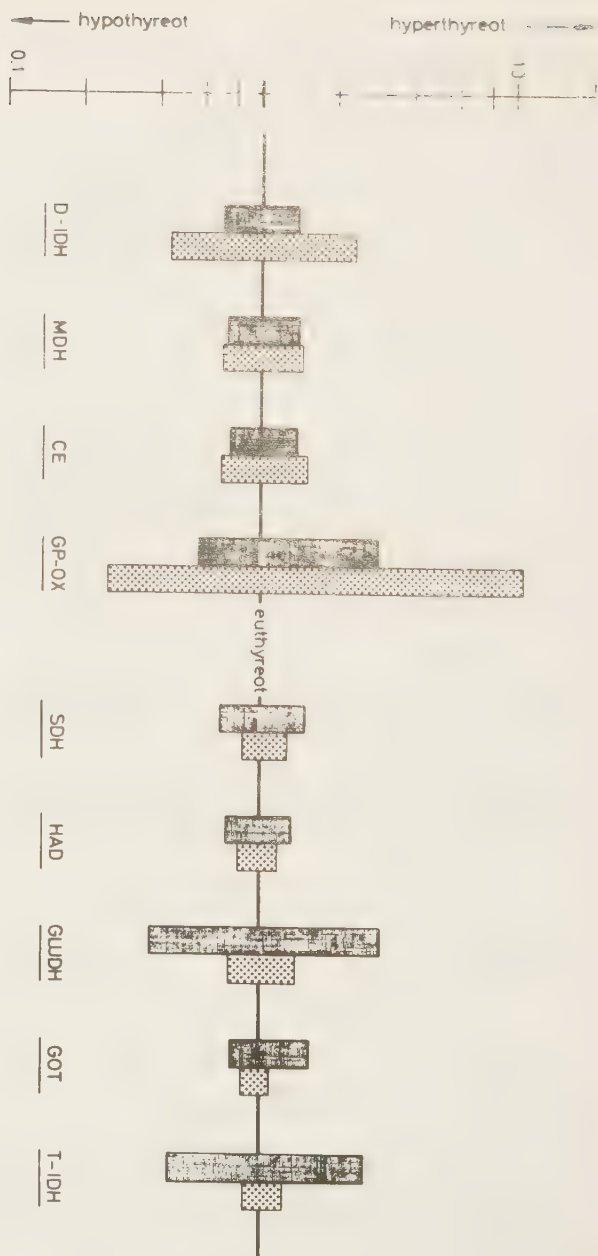


Abb. 18: Thyreoidhormon-abhängige Enzyminduktion in Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien der Rattenleber.

Die Aktivitätsgehalte in hyper- und hypothyreotem Zustand wurden für jedes Enzym auf den Aktivitätsgehalt im Normzustand (Euthyreose = 1) bezogen.

IDH	Typ	A ₁ D-IDH	A ₂ T-IDH	A = A ₁ + A ₂ D-IDH + T-IDH	D SDH	E m-IDH/SDH
hyperthyreot	I	1.3	7.0	8.3	5.6	1.48
	II	2.5	4.7	7.2	13.8	0.52
euthyreot	I	0.95	2.75	3.7	3.7	1.0
	II	1.05	3.75	4.8	10.7	0.45
hypothyreot	I	0.7	1.2	1.9	2.6	0.73
	II	0.4	3.3	3.7	9.3	0.4

MDH	Typ			A m-MDH	D SDH	E m-MDH/SDH
hyperthyreot	I			96.7	5.6	17.3
	II			329	13.8	24
euthyreot	I			68	3.7	18.4
	II			225	10.7	21
hypothyreot	I			56	2.6	21.5
	II			174	9.3	18.7

GOT	Typ			A m-GOT	D SDH	E m-GOT/SDH
hyperthyreot	I			29	5.6	5.2
	II			92	13.8	6.7
euthyreot	I			18	3.7	4.9
	II			84	10.7	7.85
hypothyreot	I			12	2.6	4.6
	II			71	9.3	7.6

Abb. 19: Proportionen der mitochondrialen Aktivitäten von D-IDH, T-IDH, MDH und GOT bei Hyper-, Eu- und Hypothyreose. Die Enzymaktivitäten wurden für beide Mitochondrientypen getrennt auf die jeweilige Aktivität der SDH bezogen (Spalte E). Im Falle der IDH wurden die Aktivitäten des DPN- und des TPN-spezifischen Enzyms addiert. Der Berechnung liegen die Werte der Abb. 15 zugrunde.

werden. Dabei beruht der Zuwachs in den Typ-I-Mitochondrien hauptsächlich auf einem Anstieg der TPN-spezifischen, in den Typ-II-Mitochondrien vorwiegend auf einem Anstieg der DPN-spezifischen Aktivität.

5. Proportionen mitochondrialer Enzymaktivitäten:

Beim Vergleich der Mitochondrien verschiedenster Organe wurde mit Ausnahme der beiden Isocitrat-Dehydrogenasen Proportionskonstanz der übrigen Enzyme des Citratcyclus festgestellt [32, 34]. Wohl aber erwies sich beim Vergleich von Mitochondrien verschiedener Organe, daß die Summe der Aktivitäten beider Isocitrat-Dehydrogenasen in jeweils angenäherter konstanter Proportion zu den Aktivitäten der übrigen Enzyme des Citratcyclus steht. Trotz unterschiedlicher Funktion für den Fluß des Wasserstoffs wirken beide Isocitrat-Dehydrogenasen im Hauptweg des Tricarbonsäurecyclus. Änderungen ihrer Aktivitätsgehalte sollten demnach ebenfalls in konstanter Beziehung zu den übrigen Enzymen des Citratcyclus stehen.

Dieses Postulat soll in der Tabelle Abb. 19 oben belegt werden. Hier sind die wieder aus 9 bis 16 Versuchen gemittelten spezifischen Aktivitäten von DPN- und TPN-spezifischer IDH in hyper-, eu- und hypothyreotem Status für beide Mitochondrientypen sowie die entsprechenden Aktivitätsgehalte der SDH zusammengestellt. Wie beim Vergleich von Mitochondrien verschiedenster Organe stehen auch hier die Aktivitäten von D-IDH oder T-IDH in untereinander nicht vergleichbarer Relation zur SDH (vgl. auch Abb. 16). Andererseits erweist sich die Summe der Aktivitäten der beiden Isocitrat-Dehydrogenasen als in einigermaßen konstantem Verhältnis zur SDH des jeweiligen Mitochondrientyps stehend (Spalte E). Allerdings ist der Aktivitätsquotient IDH/SDH für beide Mitochondrientypen eine ganz spezifische Größe.

Ähnliches gilt für die im mittleren und unteren Teil der Tabelle (Abb. 19) aufgeführten Aktivitätsgehalte der MDH und der GOT in beiden Mitochondrientypen (Mittelwerte aus 6 bis 12 Versuchen). Bei beiden Enzymen ist die Konstanz der Relation zur entsprechenden SDH-Aktivität in allen drei Thyreoid-Statzen zumindest angedeutet, was besonders für die nicht im Hauptweg des Citratcyclus stehende GOT bemerkenswert ist. Die MDH zeigt darüberhinaus unter dem Einfluß von Thyreoidhormon im Typ I einen leichten Abfall, im Typ II dagegen einen leichten Anstieg ihrer Relation zur SDH. Dieses leicht inverse Verhalten ist auch im Muster der relativen Aktivitäten (Abb. 16) zu erkennen. Die Unterschiede der Aktivitätsquotienten zur SDH zwischen Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien sind dagegen bei MDH und GOT nicht so stark ausgeprägt wie oben im Falle der

Isocitrat-Dehydrogenasen.

Die soeben geführte Betrachtung betrifft den Bereich der mitochondrialen Organisation. Insetten sind die differentiellen Größen der Aktivitätsquotienten beispielweise der Isocitrat-Dehydrogenasen zur SDH in den beiden Mitochondrientypen als Ausdruck der Differenzierung wie der nahezu gleichbleibende Wert dieser Größe im einzelnen Mitochondrientyp während hypo-, eu- und hyperthyreotem Zustand. Das heißt, auch unter hormonell induzierten Veränderungen der Enzymaktivitätsmuster bleibt die Eigenständigkeit der beiden Mitochondrientypen gewahrt.

III. Einflüsse von Hyper- und Hypothyreose auf gesamtzelluläre Enzymaktivitäten.

Ein neuer Aspekt ergibt sich, wenn die Betrachtung über den Bereich der mitochondrialen auf die Ebene der zellulären Organisation erweitert wird. Eine solche Betrachtung wird möglich, wenn bestimmte extramitochondriale Enzymaktivitäten mit einbezogen werden.

1. Extramitochondriale Aktivitäten "intrazellulär-mehrörtiger" Enzyme

Wird ein Teil des Leber-Gesamthomogenats parallel zur Isolierung der Mitochondrien fraktioniert extramitochondrial, so können in dem erhaltenen Überstand cytoplasmatische Enzymaktivitäten bestimmt werden. Für die vorliegende Arbeit waren die extramitochondrialen Anteile gleichzeitig bestimmter mitochondrialer Aktivitäten besonders bei den sog. "Typ-III-Enzymen" [58], wie T-IDH, MDH und GOT, von Interesse. Wie bereits (S. 23) ausgeführt, können intra- und extramitochondrial gemessene Aktivitäten eines bestimmten Enzyms erst nach Umrechnung entweder des ersten Anteils auf cytoplasmatische Basis oder des letzteren Anteils auf mitochondriale Basis zahlenmäßig miteinander verglichen werden. Hier wurde aus praktischen Erwägungen heraus die zweite Möglichkeit gewählt; die Umrechnung erfolgte durch Multiplikation der extramitochondrialen spezifischen Aktivitäten mit dem zuvor bestimmten sog. SDH-Faktor. Er betrug, gemittelt aus 6 bis 12 Versuchen, 3,6, 4,13 und 4,9, jeweils in hypo-, eu- und hyperthyreotem Status. Diese Umrechnung ermöglicht es nun, die in Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien getrennt ermittelten Enzymaktivitätsgehalte in direkte Beziehung zu ihrem extramitochondrialen Akti-

vitätsanteil zu setzen und damit die Potenz des gesamten zellulären Substratumsatzes zu erfassen. Im folgenden soll diese Betrachtung angestellt werden.

2. Zelluläre Proportionen:

In der Tabelle der Abb. 20 ist die Bilanzierung der zellulären Aktivitätsanteile von D-IDH + T-IDH, sowie von MDH und GOT durchgeführt. Den Summen der Aktivitätsgehalte in beiden Mitochondrientypen (Spalte A) sind jeweils die entsprechenden korrigierten extramitochondrialen Aktivitätsanteile (Spalte B) zugeordnet. Wird die in Spalte C addierte gesamtzelluläre Enzymaktivität auf die Gesamtaktivität der SDH (D) bezogen, so ergeben sich die in der letzten Spalte (E) der Tabelle verzeichneten Werte. Hier zeigt sich nun bei allen drei Enzymen jeweils eine erstaunliche Konstanz.

Sie besagt für den Fall der IDH, daß unabhängig von den herausgestellten Unterschieden des Mitochondrientyps und unabhängig von den unterschiedlichen Bewegungen der Aktivitäten beider Isocitrat-Dehydrogenasen unter dem Einfluß von Thyreoidhormon, im zellulären Bereich die Potenz der Isocitrat-Oxydation konstant auf die der Succinat-Oxydation abgestimmt ist. Beide Größen fallen oder steigen in konstantem Verhältnis bei Schilddrüsen-Unter- bzw. Überfunktion.

Im Falle der MDH überrascht dieser Befund weniger, sie fand sich bereits bei der Analyse der beiden Mitochondrientypen in vergleichbarer (Abb 11) und unter Thyreoidhormon-Wirkung in nur **wenig** inverser (Abb. 16, 19) Relation zur SDH. Vollkommen wird die Konstanz allerdings erst durch die Bewegungen des cytoplasmatischen MDH-Anteils, der sich damit als eindeutig Citratcyclus-orientiert erweist.

Bei der GOT deren spezifische Relation zur SDH in beiden Mitochondrientypen auch bei Hypo- und Hyperthyreose erhalten blieb, ist diese zelluläre Proportionskonstanz zur SDH und damit zum Citratcyclus nicht minder auffällig. Sie zeigt, daß auf zellulärer Ebene die Potenz dieser Transaminierungsreaktion unabhängig vom jeweiligen Thyreoidstatus ebenfalls konstant auf die "Citratcyclus-Potenz" abgestimmt ist.

3. Induzierbarkeit zellulärer Enzymaktivitäten:

Die in der Abb. 20 verzeichnete Konstanz der gesamten zellulären Aktivität der betrachteten drei Enzyme zur SDH beruht in erster Linie auf

Krankheit	Typ	mitochondrial		extramitochondrial	zellulär	D SDH	E Gesamt-IDH/SDH
		A ₁ a-IDH	A ₂ T-IDH	B c-T-IDH	C = A ₁ +A ₂ +B Gesamt-IDH		
hyperthyreot	1+II	2,8	11,7	36,7	46,2	19,4	2,36
euthyreot	1+II	3,1	7	29,4	34,9	14,4	2,42
hypothyreot	1+I	1,1	4,5	23,5	29,1	11,9	2,45

Krankheit	Typ	mitochondrial	extramitochondrial	zellulär	D SDH	E Gesamt-MDH/SDH
		A m-MDH	B c-MDH	C = A+B Gesamt-MDH		
hyperthyreot	1+II	116	565	991	19,4	51,0
euthyreot	1+II	293	418	711	14,4	49,4
hypothyreot	1+II	224	366	584	11,9	49,6

Krankheit	Typ	mitochondrial	extramitochondrial	zellulär	D sGL	E Gesamt-GUT/sGL
		A m-GUT	B c-GUT	C = A+B Gesamt-GUT		
hyperthyreot	1+II	121	71	192	19,4	9,9
euthyreot	1+II	162	39	141	14,4	9,6
hypothyreot	1+II	83	32	115	11,9	9,7

Abb. 20: Proportionen der gesamten Aktivitäten von IDH, MDH und GOT bei Hyper-, Eu- und Hypothyreose. Die Aktivitätsgehalte bei der Mitochondrientypen und auch die extramitochondrialen Aktivitätsanteile wurden für jedes Enzym addiert und auf die gesamte Aktivität der SDH bezogen. Der Berechnung liegen wieder die Werte der Abb. 15 zugrunde. Im Falle der extramitochondrialen Aktivitäten wurden die Mittelwerte aus 6 bis 12 Versuchen verwendet ($\mu\text{Mol/ml} \times \text{mg Gesamtprotein}$). Die Umrechnung auf mitochondriale Basis erfolgte durch Multiplikation mit dem sog. SDH-Faktor (S. 23, 49).

kompensatorischen Bewegungen von bei den einzelnen Enzymen ganz unterschiedlichen compartimentellen Aktivitätsanteilen.

Im Falle der IDH sind dies weniger der cytoplasmatische Anteil des TPN-spezifischen Enzyms, als vielmehr die intramitochondrialen Aktivitäten beider Enzyme. Wie die Abb. 21 zeigt, ist hier tatsächlich der Einfluß von Hypo- und Hyperthyreose auf den Spiegel der extramitochondrialen T-IDH sehr gering. Im Gegensatz dazu sind die Veränderungen des cytoplasmatischen Aktivitätsanteils der GOT (Abb. 21) wesentlich ausgeprägter. Eine Mittelstellung nimmt die MDH ein; Thyreoidhormon-abhängige Induktion und Repression ihres extramitochondrialen Anteils ist hier nur wenig geringer als diejenige der Aktivitätsgehalte in den beiden Mitochondrientypen.

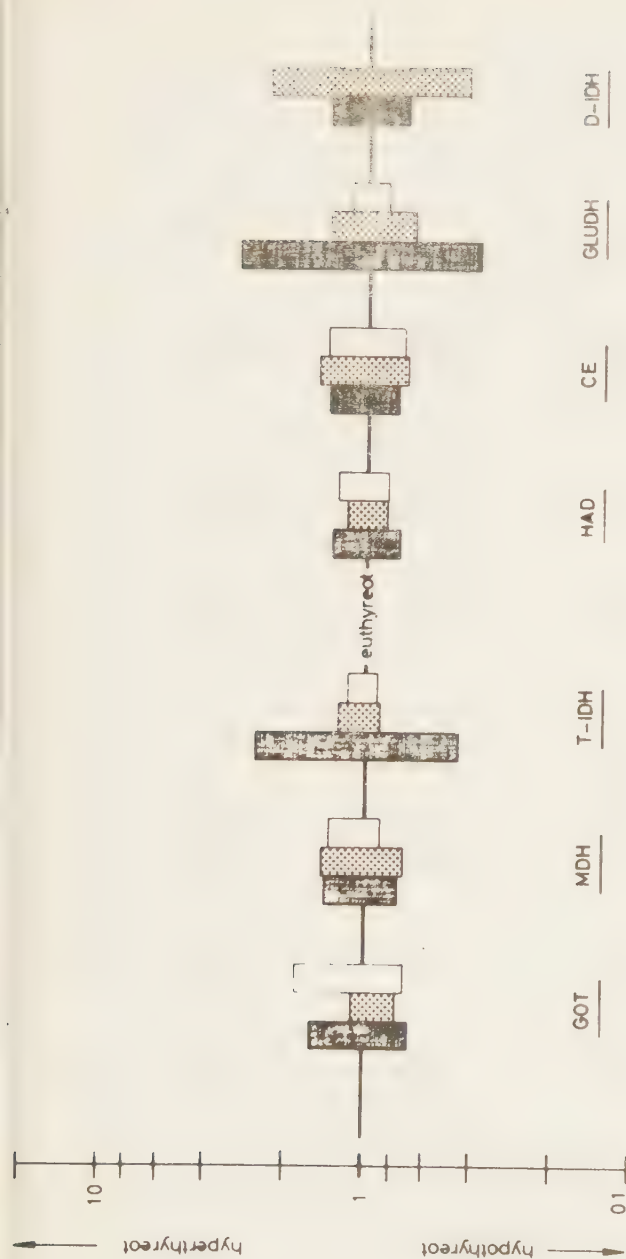
In der rechten Hälfte der Abb. 21 sind neben den bereits aus der Abb. 18 bekannten mitochondrialen Induktionsgrößen der ausschließlich intramitochondrial lokalisierten löslichen "Typ-II-Enzyme" [58] wie HAD, CE und GluDH, auch deren extramitochondrial meßbare Induktionsgrößen verzeichnet. Sie sind bei den betrachteten drei Enzymen von vergleichbarem Ausmaß und beruhen auf zwar geringen, jedoch konstant im Überstand des fraktioniert extrahierten Gesamthomogenats nachweisbaren cytoplasmatischen Aktivitäten dieser Enzyme. Ihr Anteil an der zellulären Gesamtaktivität beträgt (nach erfolgter Umrechnung) ziemlich unabhängig vom jeweiligen Thyreoidstatus durchschnittlich (Mittelwerte aus 4 bis 8 Versuchen) ca. je 5 % bei GluDH und CE, dagegen fast 13 % bei der HAD. Diese extramitochondrial gemessenen Aktivitäten von Typ-II-Enzymen dürften jedoch nur zum Teil auf während der Präparation zerstörte Mitochondrien zurückzuführen sein, da sowohl die Homogenisation des Lebergewebes als auch die darauf folgende Extraktion des Homogenats so schonend wie möglich erfolgten.

4. Synopsis gesamtzellulärer Enzymaktivitäten und ihrer Bewegungen

Abb. 22 faßt die vorstehend mitgeteilten Befunde auf zellulärer Ebene graphisch zusammen:

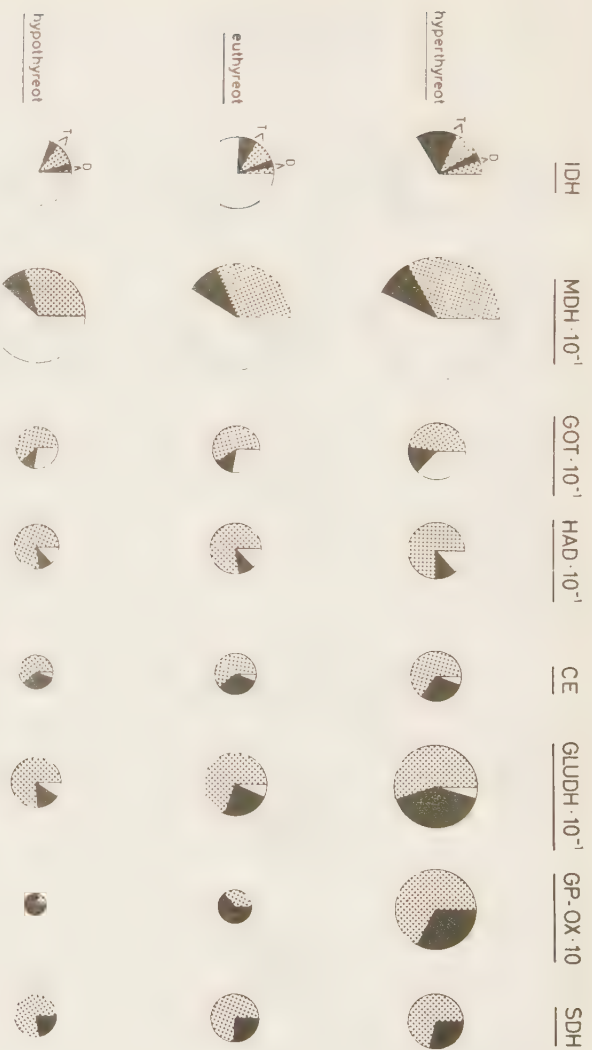
Bei dieser Darstellungsweise repräsentiert die Größe der Kreisfläche die Größe der gesamtzellulären spezifischen Enzymaktivität, die Fläche der einzelnen Sektoren repräsentiert den Enzymgehalt der unterschiedenen Zellcompartimente: extramitochondrialer Raum, Typ-I-Mitochondrien, Typ-II-Mitochondrien.

Die Art der gewählten Darstellung ermöglicht so die Synopsis nicht nur der absoluten Größe der gesamtzellulären Enzymaktivitäten und ihrer Verände-



Thyroidhormon abhängige Enzyminduktion in TYP-I , TYP-II , Mitochondrien und Cytoplasma  der Rattenleber.

Abb. 21- Thyroidhormon-abhängige Induktion löslicher mitochondrialer Enzyme und ihrer extramitochondrialen Anteile. Die Aktivitätsgehalte in Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien sind gesondert dargestellt. Die extramitochondrialen Aktivitäten wurden am Gesamthomogenat gemessen und mit Hilfe des sog. SDH-Faktors (S 23, 49) umgerechnet. In allen Fällen wurden die Aktivitätsgehalte in hyper- und hypothyreotem Zustand auf den Aktivitätsgehalt im Normzustand (Euthyreose = 1) bezogen.



Extramitochondrial: Mitochondrial: TYP I TYP II

Abb. 22. Synopsis der spezifischen Aktivitäten von IDH, MDH, GOT, HAD, CE, GLUDH, GP-Ox und SDH in der Ratteleber bei Hyper-, Eu- und Hypothyreose. Für jedes Enzym repräsentiert die Größe der Kreisfläche die gesamtzelluläre Aktivität. Die Fläche der einzelnen Sektoren entspricht den Aktivitätsgewichten des extramitochondrialen Raumes, der Typ-I- und der Typ-II-Mitochondrien.

rungen unter dem Einfluß von Thyreoidhormon, sondern auch der Aktivitätsanteile der einzelnen Zellcompartimente und ihrer hormonell bedingten Verschiebungen untereinander. Darüber hinaus können infolge der Auftragung im gleichen Maßstab sämtliche Werte der einzelnen Enzyme auch untereinander direkt oder unter Einschluß einer Zehnerpotenz verglichen werden. Legt man an die die Aktivitäten eines bestimmten Enzyms repräsentierenden Kreise die gemeinsame Tangente, so ist außerdem noch eine Aussage über das Vorliegen von Linearität oder Nicht-Linearität der hormonellen Enzyminduktion möglich.

Diskussion

I. Heterogenität der Mitochondrienpopulation der Rattenleber:

1. Auftrennbarkeit in zwei hauptsächliche Fraktionen:

Der in dieser Arbeit geführte Nachweis differenter Mitochondrienpopulationen der Rattenleber gründet sich auf Ergebnisse der Präparation und der enzymatischen Analyse. Bereits die Präparation liefert Argumente für die Existenz verschiedener Mitochondrientypen der Leber: Sowohl durch Differential-zentrifugation als auch durch Zentrifugation im Dichtegradienten lassen sich mindestens zwei partikuläre Fraktionen gewinnen, die aufgrund ihrer enzymatischen Ausstattung als Mitochondrien charakterisiert sind. Beide Fraktionen enthalten ein für Mitochondrien typisches Enzymspektrum. Die in dieser Arbeit niedergelegten Befunde stehen darum nicht isoliert, sondern werden durch ähnliche und von anderen Autoren berichtete Ergebnisse bestätigt [6, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 18].

2. Möglichkeiten der Artefakt-Bildung:

Durch die Einbeziehung einer größeren Anzahl von Enzymen in die enzymatische Analyse kommt den hier mitgeteilten Ergebnissen vielleicht aber besondere Beweiskraft zu. Sie betrifft nicht nur die Charakterisierung der beiden isolierten Partikelfraktionen als Mitochondrien, sondern richtet sich auch gegen die Möglichkeit eines Artefaktes. Eine Abgrenzung differenter Mitochondrientypen allein auf der Grundlage unterschiedlichen Verhaltens im Schwerfeld, Verschiedenheit der Dichte oder differenter Mobilität bei der Elektrophorese wäre unzureichend. Eine auf diese Weise durchgeführte Differenzierung verschiedener Mitochondrientypen könnte sehr wohl zu artefiziellen Befunden führen, die ihre Ursache in der Abtrennung der Mitochondrien von mitochondrialen Bruchstücken oder anderen Zellorganellen bzw. deren Fragmenten haben.

Gegen die Isolierung einer "leichten" und einer "schweren" Mitochondrienpopulation lassen sich sehr wohl Einwände dieser Art erheben. Insbesondere könnte sich ein solcher Einwand gegen die Existenz der leichten Mitochondrien, die in dieser Arbeit als Typ I bezeichnet werden, richten. Diese Mitochondrien, die einen geringeren Anteil an der gesamten Mitochondrien-

population der Leber haben als die schweren Typ-II-Mitochondrien (Abb. 9), könnten möglicherweise Bruchstücke darstellen, die während der Präparation entstanden sind.

4. Argumente für die Bezeichnung „Typ-I-Mitochondrien“

a. Uneinheitlichkeit beider Fraktionen:

Für die Beantwortung der gestellten Fragen erscheint wichtig, daß die in dieser Studie im Dichte-Gradienten aufgetrennte Mitochondrienpopulation präparativ in zwei hauptsächliche Fraktionen zerlegt wurde. Beide Fraktionen sind aber wahrscheinlich in sich nicht einheitlich, sondern beinhalten in statistischer Verteilung unterschiedliche Mitochondrien. Die Zerlegung der im Dichte-Gradienten aufgetrennten Lebermitochondrien in eine größere Anzahl von Fraktionen (Abb. 5) und der Vergleich der in den einzelnen Fraktionen meßbaren Aktivitäten von SDH und GP-Ox läßt deutlich zwei nach Position im Gradienten unterschiedliche Maxima der Enzymaktivitäten erkennen. Die absolute Höhe der Enzymaktivitäten ist aber in den beiden Maxima in bezug aufeinander unterschiedlich, so daß der Quotient beider Aktivitäten stark variiert. Die Analyse des Aktivitätsquotienten GP-Ox/SDH im fraktionierten Gradienten (Abb. 7) ergibt ein Minimum und ein Maximum. Das Minimum und das Maximum dieses Quotienten decken sich jeweils annähernd mit den beiden als I und II bezeichneten Proteinmaxima. Der Verlauf des Aktivitätsquotienten GP-Ox/SDH in den im Gradienten aufgetrennten Mitochondrien und das Ausmaß seiner Schwankung um den Faktor 10 zeigen deutlich an, daß sich zwischen den auf der Grundlage des Quotienten abgrenzbaren Extremen Misch- oder Übergangsformen befinden. Die präparativ gewonnene Mitochondrienpopulation vom Typ I kann darum auch keineswegs als einheitlich bezeichnet werden.

b. Intaktheit der Typ-I-Mitochondrien:

Damit wird bereits das Argument, daß es sich bei den Typ-I-Mitochondrien um mitochondriale Fragmente handeln könne, erheblich abgeschwächt oder gar hinfällig. In diesem Falle sollte nämlich der Quotient GP-Ox/SDH, der das Verhältnis zweier mitochondrial-strukturgebundener Enzyme angibt, konstant sein. Weiterhin sollte der Quotient GP-Ox/SDH in den Fraktionen der Typ-I-Mitochondrien mit demjenigen der Typ-II-Mitochondrien übereinstimmen, wenn die Typ-I-Mitochondrien lediglich fragmentierte Typ-II-Mitochondrien wären. Auch der Einwand, es handle sich bei den

Typ-I-Mitochondrien um Bruchstücke einer in sich heterogenen Mitochondrienpopulation, ist nur insoweit zutreffend, als er die Existenz einer Heterogenität der Mitochondrienpopulation zugrunde legt. Er wird ohnehin durch die unterschiedliche Größe des GP-Ox/SDH-Quotienten in den beiden Hauptfraktionen entkräftet.

Ein weiteres Argument auf experimenteller Grundlage ist der in Abb. 12 dargestellte Versuch. Die Tatsache, daß mehrfache Waschungen der Typ-I-Mitochondrien nicht zu einem Verlust löslicher Enzymproteine führen, besagt, daß es sich bei den Typ-I-Mitochondrien um intakte Strukturen handelt. Das Enzymaktivitätsmuster der aus Typ-I-Mitochondrien durch mechanische Desintegration gewonnenen mitochondrialen Fragmente unterscheidet sich darum auch sehr maßgeblich von demjenigen der intakten Mitochondrien. In der Fraktion mitochondrialer Bruchstücke sind die löslichen Enzyme in bezug auf die strukturgebundenen mit zehnfach geringerer Aktivität vertreten.

c. Konstante und spezifische Enzymproportionen als Ausdruck der metabolischen Differenzierung:

Von ausschlaggebender Bedeutung sind schließlich die in den beiden Mitochondrientypen identischen Proportionen, in denen die Aktivität der (löslichen) MDH zur Aktivität der (strukturgebundenen) SDH steht. In beiden Mitochondrientypen entspricht dieses Aktivitätsverhältnis demjenigen, welches beim Vergleich von Mitochondrien verschiedener Gewebe und Organe regelmäßig festgestellt wurde [32, 33, 34]. In bezug auf diese Enzyme — die eine "proportionskonstante" Einheit im Enzymaktivitätsmuster verschiedenster Mitochondrien bilden, ist eine Verschiedenart der Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien ohnehin nicht zu erwarten. Der Nachweis dieser proportionskonstanten Einheit besagt aber, daß es sich sowohl bei Typ I als auch bei Typ II um intakte Mitochondrien handelt.

Im Gegensatz zur Proportionskonstanz der Aktivitäten von MDH und SDH, die übrigens auch die Aktivität der GluDH betrifft, ist die Spezifität der Proportionen, in denen die übrigen hier untersuchten Enzyme stehen, beweisend für die Eigenständigkeit von Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien. Unterschiede in den Gehalten, und damit auch Spezifität der Proportionen, finden sich nicht nur für mehrere lösliche Enzyme, sondern auch im Falle der strukturgebundenen GP-Ox.

Die enzymatische Analyse ermöglicht zweierlei Feststellungen:

In bezug auf die Proportionskonstanz der Aktivitäten von MDH, GluDH und SDH sind Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien der Leber miteinander vergleichbar und zugleich beide als intakte Mitochondrien ausgewiesen.

Unterschiede in den Gehalten und Proportionen der Aktivitäten von GP-Ox, D-IDH, T-IDH, CE, GOT und HAD zeigen andererseits die in bestimmten Bereichen der enzymatischen Organisation verwirklichte metabolische Differenzierung der beiden Mitochondrientypen.

Die metabolische Differenzierung kommt ausgeprägt in den unterschiedlichen Proportionen der GP-Ox der HAD und der beiden Isocitrat-Dehydrogenasen zum Ausdruck. Hinsichtlich der GP-Ox betrifft der Unterschied das Stoffwechselsegment der Glycerophosphat-Oxydation. Die Bedeutung der α -GP-Oxydation ist in der Leber möglicherweise nicht nur für den extramitochondrial/mitochondrialen Wasserstoff-Transport, sondern auch für den Mechanismus der Gluconeogenese aus α -Glycerophosphat zu sehen. Nach der enzymatischen Analyse verfügen die Typ-I-Mitochondrien für diese Funktion über eine höhere Potenz. Auch die hier höhere Aktivität der TPN-spezifischen IDH weist auf eine höhere Potenz für Syntheseleistungen hin. Die im Vergleich zum Typ II ebenfalls höhere Aktivität des CE steht vielleicht weniger im Dienste der Substrat-Endoxydation im Citratcyclus als im Dienste der Bereitstellung von Citrat für im extramitochondrialen Raum über die Wirkung des citrate-cleavage-enzyme [59] vom Acetyl-CoA ausgehende Synthesen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die in den Typ-I-Mitochondrien niedrigere Aktivität der HAD. Als Enzym der β -Oxydation der Fettsäuren dient die HAD dem oxydativen und energieliefernden Stoffwechsel. Bei niedrigerer Aktivität des CE in den Typ-II-Mitochondrien übertrifft hier die Aktivität der HAD diejenige in den Typ-I-Mitochondrien beträchtlich. Der Aktivitätsquotient HAD/CE, und damit die Systemkorrelation "Fettsäureoxydation/Citratcyclus" ist in beiden Mitochondrientypen invers und beträgt im Typ I 4 und im Typ II 18.

d. Unterschiedliche Wirkungen des Thyreoidhormons auf beide Mitochondrientypen:

Nicht nur auf der Grundlage einer vergleichenden Analyse der Enzymaktivitätsmuster lassen sich Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien als Vertreter differenter Mitochondrienpopulationen des Leberparenchyms abgrenzen. Die Eigenständigkeit der beiden Mitochondrientypen kommt

nicht minder deutlich in den durch Thyreoidhormon unterschiedlich induzierbaren Veränderungen ihrer Enzymaktivitätsmuster zum Ausdruck (Abb. 14 und 16). Die unterschiedliche Induzierbarkeit der beiden Typen ist damit ein weiterer Beweis für ihre Existenz.

Die unter dem Einfluß von Thyreoidhormon in beiden Mitochondrientypen induzierten Enzymanstiege sind zum Teil sehr unterschiedlich. Charakteristisch ist in beiden Typen das unterschiedliche Verhalten der GP-Ox, der beiden Isocitrat-Dehydrogenasen und der GluDH. Obwohl sich die Enzymaktivitätsmuster der beiden Mitochondrientypen bei Hyperthyreose zum Teil angleichen, bleiben auch hier charakteristische Unterschiede bestehen. Am ausgeprägtesten unterscheiden sich beide Mitochondrientypen im hypothyreoten Zustand. Hier besteht höchste Signifikanz der Unterschiede (Abb. 15).

Neben der unterschiedlichen Beeinflussung der Enzymaktivitätsmuster beider Mitochondrientypen durch Thyreoidhormon ist ein sehr wesentlicher Befund die unterschiedliche Induzierbarkeit der beiden Mitochondrientypen selbst. Unter dem Einfluß von Thyreoidhormon ändert sich das Mengenverhältnis der beiden Mitochondrienpopulationen, wobei den Werten des gesamten mitochondrialen Proteins (Abb. 9) zu entnehmen ist, daß beide Typen verschieden stark induziert werden. Hier kommt deutlich eine morphogenetische Wirkung des Thyreoidhormons zum Ausdruck.

Im übertragenen Sinne sind auch die unterschiedlichen Wirkungen des Schilddrüsenhormons auf die Enzymaktivitätsmuster der beiden Mitochondrientypen durchaus als morphogenetische Effekte zu bezeichnen. Das Beispiel der beiden strukturgebundenen Dehydrogenasen GP-Ox und SDH ist in diesem Zusammenhang relevant. Beide Enzyme werden nicht nur unterschiedlich, stark induziert, sondern verhalten sich unter dem Einfluß von Thyreoidhormon in beiden Mitochondrientypen auch different. Vom hypo- zum hyperthyreoten Status steigt die spezifische Aktivität der GP-Ox in den Typ-II-Mitochondrien um mehr als das 40-fache, in den Typ-I-Mitochondrien um den Faktor 5. Wesentlich geringer sind die Aktivitätsanstiege der SDH in den beiden Mitochondrientypen. Im Gegensatz zur GP-Ox ist hier der Typ I durch einen stärkeren Aktivitätszuwachs gekennzeichnet. Ähnliche Unterschiede bestehen auch im Falle der löslichen Enzyme und gestatten die Abgrenzung zweier in den beiden Mitochondrientypen unterschiedlich induzierbarer Enzymgruppen (Abb. 18). Auch in bezug auf die qualitative Zusammensetzung des Enzymapparates ist damit die morphogenetische Wirkung des Thyroidhormons auf beide Typen unterschiedlich.

II. Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien unter histotopischem Aspekt:

1. Herkunft beider Mitochondrientypen:

Die Isolierung zweier Mitochondrienpopulationen aus dem Lebergewebe wirft die berechnigte Frage auf, ob beide dem Leberparenchym, d. h., den eigentlichen Leberzellen entstammen. Sehr wohl könnte eine der beiden Mitochondrienpopulationen z. B. den Zellen des Lebermesenchyms oder der Epithelzellen der Gallengänge zugehören. Der relativ geringere Anteil der Typ-I-Mitochondrien an der gesamten Mitochondrienpopulation der Leber (Abb. 9) könnte durchaus Anlaß zu einer Überlegung in dieser Richtung geben. Tatsächlich läßt sich diese Frage nicht eindeutig beantworten.

Hinweise dafür, daß es sich im Falle beider Mitochondrienpopulationen aber dennoch um Mitochondrien des Leberparenchyms handelt, ergeben sich aus den von verschiedenen Autoren, insbesondere von PETTE und BRANDAU [30] veröffentlichten Daten der histotopischen Verteilung bestimmter mitochondrialer Enzyme des Leberläppchens. Die Aktivität der SDH zeigt ein von periportal nach perizentral gerichtetes Gefälle, während die GP-Ox periportal und perizentral mit gleicher Aktivität nachweisbar ist. Für die I-ADH und GlDH wurde eine der SDH entgegengerichtete Verteilung gefunden. Beide Enzyme sind mit höherer Aktivität im Läppchenzentrum als in der Läppchenperipherie vertreten. PETTE und BRANDAU [31] haben aus diesen Befunden die Existenz zweier verschiedener Mitochondrienpopulationen mit unterschiedlicher Verteilung im Leberläppchen abgeleitet.

2. Mögliche intralobuläre Verteilung beider Mitochondrientypen

Im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten Befunde erscheint der Versuch einer histotopischen Zuordnung von Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien anhand der histochemischen Daten gerechtfertigt. Die höhere Aktivität der SDH im peripheren Läppchen läße sich damit erklären, daß die Typ-II-Mitochondrien vorwiegend den periportal-ten Parenchymzellen entstammen, und daß der Gehalt der Leberzellen an Typ-II-Mitochondrien in Richtung auf das Läppchenzentrum abnimmt. Bei geringerem zellulärem Mitochondriengehalt müßten im Läppchenzentrum andererseits Mitochondrien vom Typ I vorherrschen. Aus dieser im Läppchen entgegengerichteten Verteilung von Typ-II- und Typ-I-

Mitochondrien ließe sich, den Enzymaktivitätsmustern der beiden Typen entsprechend, ein Abfall der SDH-Aktivität von peripher nach zentral und eine etwa gleichmäßige Aktivitätsverteilung der GP-Ox konstruieren. Der spezifisch höhere Gehalt der Typ-I-Mitochondrien an T-IDH wurde bei der Annahme einer solchen Verteilung der beiden Mitochondrienpopulationen ebenfalls den histochemischen Befund einer relativ höheren Aktivität der T-IDH im Läppchenzentrum erklären. Allein im Falle der GluDH ergeben sich Schwierigkeiten, das intralobuläre Aktivitätshistogramm mit perizentral höherer Aktivität in Einklang mit der angenommenen Verteilung von Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien zu bringen. Bei Annahme dieser Verteilung müßte nämlich im Aktivitätshistogramm eine in Zentrum und Peripherie vergleichbare Aktivität der GluDH resultieren.

3. Zelluläre Differenzierung und Koordination:

Es erscheint verfrüht, auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse bereits endgültige Aussagen zur histotopischen Verteilung von Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien im Leberläppchen zu machen. Andererseits ergeben sich aber doch aus den histochemischen Befunden bestimmte Hinweise in diese Richtung. Sie betreffen nicht zuletzt die Frage der zellulären Heterogenität der Mitochondrienpopulation [1]. Diese Frage stellt sich nicht allein für die hier untersuchte Leberzelle. Sie wurde im Falle der Hefezelle von AVERS et al. [20] bereits positiv beantwortet.

Das Nebeneinander von Mitochondrien verschiedenen Typs in ein und derselben Zelle kann unter dem Aspekt der Differenzierung von Zellorganellen und damit der Spezialisierung betrachtet werden. Aus den hier mitgeteilten Befunden folgt aber, daß diese Spezialisierung offensichtlich zellulär koordiniert erfolgt. Obwohl Typ-I- und Typ-II-Mitochondrien in der Leber unter dem Einfluß von Thyreoidhormon unterschiedlich stark induziert werden und die Veränderungen der Enzymaktivitätsmuster zum Teil sehr unterschiedlich sind, werden diese Effekte auf zellulärer Ebene kaum erkennbar. Das Verhältnis der gesamtzellulären Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenasen zur Aktivität der SDH ist bei Hypo-, Eu- und Hyperthyreose trotz völlig verschiedener Bewegungen der SDH und der Isocitrat-Dehydrogenasen in beiden Mitochondrientypen bzw. auch der T-IDH im extramitochondrialen Raum unverändert (Abb. 20). Die Konstanz dieser Proportion erstreckt sich ebenfalls auf MDH und GOT, wenn ihre extramitochondrialen und ihre Aktivitäten in beiden Mitochondrientypen zusammen betrachtet werden.

Diese Konstanz der zellulären Aktivitätsproportionen besagt, daß das in beiden Mitochondrientypen bei Hyper- bzw. Hypothyreose unterschiedliche Anstiegen bzw. Abfallen der Enzymgehalte offensichtlich koordiniert erfolgt.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird der Versuch unternommen, die Existenz differenter Mitochondrienpopulationen der Leber direkt, d. h. auf präparativem Wege nachzuweisen. Mit Hilfe verschiedener Methoden können zwei unterschiedliche Mitochondrientypen isoliert werden. Die Charakterisierung dieser isolierten Mitochondrientypen erfolgt einerseits statisch durch Vergleich ihrer Enzymaktivitätsmuster, andererseits dynamisch aufgrund von Veränderungen dieser Enzymaktivitätsmuster unter dem Einfluß exogen veränderter Thyreoidhormonspiegel. Durch die Einbeziehung extramitochondrialer Enzymaktivitäten werden Einblicke in das Zusammenwirken beider Mitochondrientypen auf zellulärer Ebene im Leberläppchen ermöglicht. Schließlich erlaubt der Vergleich der hier mitgeteilten Ergebnisse mit histochemischen Befunden erste Vorstellungen über die mögliche Verteilung dieser Mitochondrientypen im Leberläppchen.

1. Aus Rattenleberhomogenat können sowohl durch Differential- als auch durch Dichtegradientenzentrifugation eine schwere und eine leichte Mitochondrienpopulation isoliert werden, die bei 1 000 und 20 000 x g sedimentieren bzw. bei $q = 1,18$ und $q = 1,16$ im isopyknischen Saccharosegradienten äquilibrieren. In der trägerfreien Ablenkungselektrophorese zeigen leichte (Typ I) und schwere (Typ II) Mitochondrien unterschiedliche Beweglichkeit.
2. Lysosomale Partikel (Leitenzym: saure Phosphatase) zeigen im Dichtegradienten im Vergleich zu den beiden Mitochondrienpopulationen (Leitenzym: SDH) deutlich heterotope Maxima.
3. Bei mehrfachem Waschen der Typ-I-Mitochondrien tritt kein Verlust intramitochondrial-löslicher Enzyme (MDH, GluDH) auf. Erst nach mechanischer Zertrümmerung der Mitochondrien fallen diese in ihren Aktivitäten um mehr als eine Größenordnung ab. Es kann sich bei den Typ-I-Mitochondrien also nicht um mitochondriale Fragmente handeln.
4. Das Mengenverhältnis der aus dem Dichtegradienten isolierten Typ-I- zu Typ-II-Mitochondrien beträgt aufgrund ihres Proteingehaltes rund 1 : 4. Es wird unter dem Einfluß von Thyreoidhormon linear verändert die Menge von Typ II nimmt dabei stärker ab als die von Typ I.

5. Beide Mitochondrientypen unterscheiden sich signifikant in den spezifischen Aktivitätsgehalten sowohl strukturgebundener als auch löslicher Enzyme. Die spezifische Aktivität der SDH liegt im Typ I etwa um den Faktor 3 niedriger, die der GP-Ox dagegen um fast das Doppelte höher als im Typ II. Damit variieren die Aktivitätsquotienten GP-Ox/SDH in den beiden Typen um den Faktor 5.
In den Typ-I-Mitochondrien finden sich für die T-IDH, D-IDH und das CE höhere für die GOT und die HAD niedrigere relative Aktivitäten (SDH = 1) als in den Typ-II-Mitochondrien. Die relativen Aktivitäten der MDH und der GluDH sind in beiden Typen vergleichbar, sie stehen also in Proportionskonstanz zur SDH.
6. In beiden Mitochondrientypen sind die Aktivitätsgehalte aller untersuchten Enzyme bei Hyperthyreose erhöht, bei Hypothyreose dagegen erniedrigt. Mit Ausnahme der GP-Ox und der D-IDH ist das Ausmaß der Aktivitätsanstiege der meisten Enzyme unter Thyreoidhormon in den Typ-I-Mitochondrien größer als im Typ II. Damit zeigen die Unterschiede in den Enzymaktivitätsmustern beider Typen in hypothyreotem Status die höchste Signifikanz.
7. Die Proportionskonstanz von MDH und SDH bleibt auch bei Hyper- und Hypothyreose in beiden Mitochondrientypen erhalten. Die Aktivitätsanstiege beider Isocitrat-Dehydrogenasen verhalten sich in den beiden Typen invers: die D-IDH wird durch Thyreoidhormon in Typ I schwächer in Typ II stärker, die T-IDH dagegen umgekehrt in Typ I stärker und in Typ II schwächer induziert. Dadurch zeigt der T-IDH/D-IDH-Quotient unter dem Einfluß des Thyreoidhormons in den beiden Mitochondrientypen geradezu entgegengerichtete Veränderungen. Die Thyreoidhormon-abhängigen Bewegungen der GluDH-Aktivitäten gehen denen der T-IDH unverkennbar parallel.
8. Unterschiedlich ist in beiden Mitochondrientypen die Induzierbarkeit auch der beiden strukturgebundenen Enzyme GP-Ox und SDH. Vom hypozum hyperthyreoten Status steigt die Aktivität der GP-Ox im Typ I um den Faktor 5 und im Typ II um mehr als den Faktor 40. Die SDH steigt im Typ II um das 1,5-fache, im Typ I um mehr als das Doppelte an.
9. Die in den zwei Mitochondrientypen differente Summe der Aktivitäten beider Isocitrat-Dehydrogenasen erweist sich - ebenso wie die Aktivitäten

von MDH und GOT - in hypo-, eu- und hyperthyreotem Zustand als annähernd proportionskonstant zur entsprechenden Aktivität der SDH. Somit bleibt auch unter hormonell induzierten Veränderungen der Enzymaktivitätsmuster die Eigenständigkeit des jeweiligen Mitochondrientyps gewahrt.

10. Absolute Proportionskonstanz zur gesamtmitochondrialen SDH ergibt sich für die gesamtzellulären Aktivitäten von IDH, MDH und GOT (nach Addition der extramitochondrialen und der Aktivitäten beider Mitochondrientypen) bei unterschiedlichem Thyreoidstatus. Auf zellulärer Ebene wirken beide Mitochondrientypen offensichtlich so zusammen, daß die Potenz der Isocitrat- und Malat-Oxydation sowie der Glutamat-Oxalacetat-Transaminierung jeweils konstant auf die Potenz der Succinat-Oxydation abgestimmt ist.
11. Die Unterschiede in den Enzymaktivitätsmustern beider Mitochondrientypen werden im Hinblick auf die histochemisch festgestellte heterogene Verteilung mitochondrialer Dehydrogenasen im Leberläppchen [31] diskutiert. Unter der Annahme, daß die Typ-II-Mitochondrien bevorzugt in der Läppchenperipherie und die Typ-I-Mitochondrien in stärkerem Maße im Läppchenzentrum vertreten sind, ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung mit der intralobulären Aktivitätsverteilung von SDH, GP-Ox und T-IDH.

Abkürzungen

DPN	=	oxydiertes Diphosphopyridinnucleotid (Nicotinamid-adenin-dinucleotid, NAD)
DPNH	=	reduziertes Diphosphopyridinnucleotid (NADH)
TPN	=	oxydiertes Triphosphopyridinnucleotid (Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, NADP)
TPNH	=	reduziertes Triphosphopyridinnucleotid (NADPH)
ADP	=	Adenosin-diphosphat
CoA	=	Coenzym A
GSH	=	reduziertes Glutathion
α GP	=	α -L-Glycerophosphat
DAP	=	Dihydroxyacetonphosphat
α KG	=	α -Ketoglutarat
OA	=	Oxalacetat
PMS	=	Phenazinmethosulfat
TRA(P)	=	Triäthanolamin-(Puffer)
EDTA	=	Äthylendiamin-tetraacetat
TJT	=	3, 3', 5-Trijodthyronin
MMI	=	1-Methyl-2-mercaptopimidazol, Favistan ^R
D-IDH	=	DPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase (1. 1. 1. 41)
T-IDH	=	TPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase (1. 1. 1. 42)
MDH	=	Malat-Dehydrogenase (1. 1. 1. 37)
GluDH	=	Glutamat-Dehydrogenase (1. 4. 1. 2)
GOT	=	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Aspartat-Amino-transferase (2. 6. 1. 1)

CE	=	condensing enzyme, Citrat-Synthase (4.1.3.7)
HAD		β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (1.1.1.35)
GP-Ox		α -Glycerophosphat-Oxydase (1.1.99.5)
SDH	=	Succinat-Dehydrogenase (1.3.99.1)
s-Pase	=	saure Phosphatase (3.1.3.2)

Herrn Professor Dr. D. Pette gilt mein besonderer Dank für die Überlassung eines interessanten Themas, das ich in der angenehmen Atmosphäre seines Arbeitskreises bearbeiten konnte, sowie für viele hilfreiche Anregungen. Für wertvolle Diskussionen und manche tatkräftige Hilfe möchte ich Herrn Dr. D. Brdiczka herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Dr. Th. Bücher bin ich für die Möglichkeit, an seinem Institut zu arbeiten, zu Dank verpflichtet.

Schließlich danke ich Frau Gertraud Lusch für die sorgfältig angefertigten Abbildungen.

Literatur

- 1 Hogeboom, H.G. and Schneider, W.C.; in: The nucleic acids.
Academic Press, New York, 2, 213 (1955).
- 2 Schneider, W.C.: Biochemical constitution of mammalian mitochondria.
J. Histochem. and Cytochem. 1, 212 (1953).
- 3 Kuff, E.L. and Schneider, W.C.: Intracellular distribution of enzymes.
XII. Biochemical heterogeneity of mitochondria.
J. Biol. Chem. 206, 677 (1954).
- 4 Laird, A.K.; Nygaard, O.; Ris, H. and Barton, A.D.: Separation of mitochondria into two morphologically and biochemically distinct types.
Exptl. Cell Res. 5, 147 (1953).
- 5 Novikoff, A.B.; in: Brachet, Mirsky: The Cell.
Academic Press, New York, 2, 299 (1961).
- 6 Novikoff, A.B. and Essner, E.: The liver cell. Some new approach to its study.
Am.J. Med. 29, 102 (1960).
- 7 Novikoff, A.B. and Shin, W.Y.;
J. de Microscopie 3, 187 (1964).
- 8 Bahr, G.F. and Zeitler, E.: Study of mitochondria in rat liver.
J. Cell Biol. 15, 489 (1962).
- 9 Wilson, J.W. and Leduc, E.H.: Mitochondrial changes in the liver of essential fatty acid - deficient mice.
J. Cell Biol. 16, 281 (1963).
- 10 Parsons, D.F.; Williams, R.G. and Chance, B.: Characteristics of isolated and purified preparations of the outer and inner membranes of mitochondria.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 137, Art. 2, 643 (1966).
- 11 O'Hegarty, M.T.: ATP-induced reversal of spontaneous swelling in isolated rat liver mitochondria.
Irish J. Med. Sci. 491, 545 (1966).

- 12 Shank, R.E.; Morrison, G.; Cheng, C.H.; Karl, J. and Schwarz, R.:
Cell heterogeneity within the hepatic lobule
(Quantitative histochemistry).
J. Histochem. Cytochem. 7, 237 (1959).
- 13 Gear, A.R.L.: Some features of mitochondria and fluffy layer in
regenerating rat liver.
Biochem. J. 95, 118 (1965).
- 14 Gear, A.R.L.: Observations on iron uptake, iron metabolism, cyto-
chrome c content and cytochrome c oxidase acti-
vity in regenerating rat liver.
Biochem. J. 97, 532 (1965).
- 15 Frisell, W.R.; Patwardhan, M.V. and Mackenzie, C.G.: Quanti-
tative studies on the soluble compartments of light
and heavy mitochondria from rat liver.
J. Biol. Chem. 240, 1829 (1965).
- [16] Lusena, C. and Depocas, F.: Heterogeneity and differential fragility
of rat liver mitochondria.
Can. J. Biochem. 44, 497 (1966).
- 17 Williams, R.G. and Parsons, D.F.; in: Proc. 6th Intern. Congr.
Biochem. New York p. 670 (1964).
- 18 Swick, R.W.; Stange, J.L.; Nance, S.L. and Thomson, J.F.:
The heterogeneous distribution of mitochondrial
enzymes in normal rat liver,
Biochemistry 6, 737 (1967).
- 19 Tolani, J.A. and Talwar, G.P.: Differential metabolism of various
brain regions: Biochemical heterogeneity of mito-
chondria.
Biochem. J. 88, 357 (1963).
- 20 Avers, C.J.; Rancourt, M.W. and Fu Hailin: Intracellular mito-
chondrial diversity in various strains of *Saccharo-
myces cerevisiae*.
Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 527 (1965).

- 21 Burgos, M. H. ; Aoki, A. and Sacerdote, F. L. : Structural changes in isolated rat kidney mitochondria treated with phlorrhizine and ATP.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 370 (1964).
- 22 Luck, D. J. : Formation of mitochondria in *Neurospora crassa*.
J. Cell Biol. 16, 483 (1963).
- 23 Luck, D. J. ; in: 6th Intern. Congr. Biochem. New York,
Abstr. VIII-63 (1964).
- 24 Green, D. E. ; Lester, R. L. and Ziegler, D. M. : Studies on the mechanism of oxydative phosphorylation. I. Preparation and properties of phosphorylating electron transfer particle from beef heart mitochondria.
Biochem. Biophys. Acta 23, 516 (1957).
- 25 Lester, R. L. and Hatefi, Y. : Oxydative phosphorylation with different mitochondrial types.
Feder. Proc. 16, 210 (1957)
- 26 Hatefi, Y. and Lester, R. L. : Studies on the mechanism of oxydative phosphorylation. III. Phosphorylating particle types from beef heart.
Biochem. Biophys. Acta 27, 83 (1958).
- 27 Beaufay, H. ; Bendall, D. S. ; Baudhuin, P. ; Wattiaux, R. and de Duve, C. : Tissue fractionation studies. XIII. Analysis of mitochondrial fractions from rat liver by density-gradient centrifuging.
Biochem. J. 73, 628 (1959).
- 28 De Duve, C. ; in: Hayashi, T. : Subcellular particles.
Ronald Press, New York, p. 128 (1959).
- 29 Schumacher, H. H. : Histochemical distribution of respiratory enzymes in the liver lobule.
Science 125, 501 (1957).
- 30 Rutenburg, A. M. and Seligman, A. M. : The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase.
Science 113, 317 (1951).
- 31 Pette, D. und Brandau, H. : Enzym-Histogramme und Enzymaktivitätsmuster der Rattenleber.
Enzymol. biol. clin. 6, 79 (1966).

- [32] Pette, D.; Klingenberg, M. and Bücher, Th.: Comparable and specific proportions in the mitochondrial enzyme activity pattern.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 425 (1962).
- [33] Pette, D.: Mitochondrial enzyme activities; in: Tager, J.M.; Papa, S.; Quagliariello, E. and Slater, E.C.: Regulation of metabolic processes in mitochondria. BBA Library, Amsterdam 7, 28 (1966).
- [34] Pette, D.: Plan und Muster im zellulären Stoffwechsel.
Naturwissenschaften 52, 597 (1965).
- [35] Brdiczka, D.; Pette, D. und Sippell, W.: Isolierung zweier Mitochondrientypen aus Rattenleber.
Zschr. Klin. Chem. 3, 199 (1965).
- [36] Brdiczka, D.; Sippell, W. und Pette, D.: Verhalten zweier Mitochondrientypen der Rattenleber bei Über- und Unterfunktion der Schilddrüse.
Vortrag, gehalten auf der Herbsttagung d. Dt. Ges. f. Biol. Chemie, Marburg/Lahn (1966).
- [37] Kadenbach, B.: Der Einfluß von Thyreoidhormonen in vivo auf die oxydative Phosphorylierung und Enzymaktivitäten in Mitochondrien.
Diss. Phil. Fak. Marburg/Lahn (1964) sowie Biochem. Z. 344, 49 (1966).
- [37a] Kadenbach, B.; Goebell, H. and Klingenberg, M.: Differential action of thyroid hormones on enzyme levels of the DPN and TPN specific isocitrate dehydrogenase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 335 (1964).
- [37b] Kadenbach, B.: Effect of thyroid hormones on mitochondrial enzymes; in: Tager, J.M.; Papa, S.; Quagliariello, E. and Slater, E.C.: Regulation of metabolic processes in mitochondria.
BBA Library, Amsterdam 7, 508 (1966).
- [38] Brock, N. und Lorenz, D.: Zur Pharmakologie des 1-Methyl-2-mercaptoimidazols.
Arzneim. Forsch. 4, 20 (1954).

- 39 Schneider, W.C. and Hogeboom, H.G.; in: Colowick and Caplan: **Methods of enzymology**. Acad. Press, New York 1, 16 (1955).
- 40 Brdiczka, D. und Hannig, K.: unveröffentlicht (1964).
- 41 Goebell, H. und Klingenberg, M.: DPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase der Mitochondrien. I. Kinetische Eigenschaften, Vorkommen und Funktion der DPN-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase. *Biochem. Z.* 340, 441 (1964).
- 42 Ringler, R.L. and Singer, T.P.: Studies on the mitochondrial α -Glycerophosphate-Dehydrogenase. I. Reaction of the dehydrogenase with electron acceptors and the respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 234, 2211 (1959).
- 43 Arrigoni, O. and Singer, T.P.: Limitations of the phenazine metho-sulphate assay for succinic and related dehydrogenases. *Nature* 193, 1256 (1962).
- 44 Brdiczka, D.: persönliche Mitteilung (1966).
- 45 Stern, J.R.; Shapiro, B.; Stadtman, E.R. and Ochoa, S.: Enzymatic synthesis of citric acid. III. Reversibility and mechanism. *J. Biol. Chem.* 193, 703 (1951).
- 46 Beenakkers, A.M. Th.: Enzyme der Fettsäureoxydation in den Flug-muskeln von *Locusta migratoria* während ihrer Entwicklung. *Biochem. Z.* 337, 436 (1963).
- 47 Bücher, Th.; Luh, W. und Pette, D.: Einfache und zusammenge-setzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden; in: Hoppe-Seyler/Thierfelder: *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*. Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg Bd. VI/A, 292 (1964).
- 48 Frieden, C.: Glutamate Dehydrogenase. VI. Survey of purine nucleo-tide and other effects on the enzyme from various sources. *J. Biol. Chem.* 240, 2028 (1965).

- [49] Linhardt, K. und Walter, K.; in: Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim, p. 733 (1962).
- [50] Beisenherz, G.; Boltze, H.J.; Bücher, Th.; Czok, R.; Garbade, K.H.; Meyer-Arendt, E. und Pfeleiderer, G.:
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceralde-
hyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase,
Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-
Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeits-
gang.
Z. Naturforsch. 8 b, 555 (1953).
- [51] Schollmeyer, P. und Klingenberg, M.: Über den Cytochromgehalt
tierischer Gewebe.
Biochem. Z. 335, 426 (1961).
- [52] Linder, A.: Statistische Methoden.
Birkhäuser-Verlag, Basel, p. 225 (1951).
- [53] De Duve, C.; Pressman, B.C.; Gianetto, R.; Wattiaux, R. and
Appelmans, F.: Tissue fractionation studies.
VI. Intracellular distribution patterns of enzymes
in rat liver tissue.
Biochem. J. 60, 604 (1955).
- [54] Sottocasa, G.L.; Kuylenskierna, B.; Ernster, L. and Bergstrand, A.:
An electron-transport system associated with the
outer membrane of liver mitochondria.
J. Cell. Biol. 32, 415 (1967).
- [55] Bücher, Th. und Klingenberg, M.: Wege des Wasserstoffs in der
lebendigen Organisation.
Angew. Chemie 70, 552 (1958).
- [56] Luck, D.J.: The influence of precursor pool size on mitochondrial
composition in *Neurospora crassa*.
J. Cell Biol. 24, 445 (1965).
- [57] Goebell, H. und Klingenberg, M.: High activity of DPN-linked
isocitrate dehydrogenase in mitochondria from
various organs.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 13, 209 (1963).

- [58] Delbrück, A.; Zebe, E. und Bücher, Th. . Über Verteilungsmuster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von *Locusta migratoria* und ihre cytologische Zuordnung. *Biochem. Z.* 331, 273 (1959).
- [59] Sere, P.A.: The citrate cleavage enzyme. I. Distribution and purification. *J. Biol. Chem.* 234, 2544 (1959).

LEBENS LAUF

Am 21. August 1941 wurde ich als Sohn des Diplom-Physikers Karl Th. Sippell und seiner Ehefrau Irene, geb. Wolf, in Kirchheim unter Teck (Württemberg) geboren. Dort besuchte ich die Volksschule, danach in Stuttgart das altsprachlich-humanistische Karls-Gymnasium. Die letzten vier Jahre meiner Schulzeit war ich Stipendiat der Ev. theol. Seminare in Schöntal/Jagst und Urach/Württ.

Nach dem Abitur im März 1960 leistete ich zunächst meinen Wehrdienst ab und begann dann im Mai 1962 mit dem Medizinstudium in Marburg, wo ich im Februar 1963 das Vorphysikum und im Juli 1964 das Physikum ablegte. Anschließend setzte ich an der Universität München mein Studium fort, das ich im Sommer 1968 mit dem medizinischen Staatsexamen abschloß. Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistent an der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Bad Hersfeld.

Am Institut für Physiologische Chemie war ich vom Frühjahr 1965 bis zum Herbst 1967 tätig.

